

WANESSA RAMSDORF

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS FIPRONIL, NITRATO DE
CHUMBO E NAFTALENO EM PEIXES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração Genética

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA

2011



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética




PARECER


Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado a que se submeteu **WANESSA ALGARTE RANSDORF**, para fins de obter o título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".


Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.


Curitiba, 14 de fevereiro de 2011.

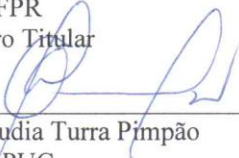
Banca Examinadora:


Profª Drª Marta Margatete Cestari
Orientadora e Presidente da Banca

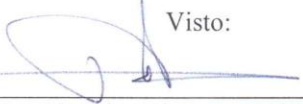

Prof. Dr. César Koppe Grisolia
Universidade de Brasília
Membro Titular


Prof. Dr. Marcos Vinícius Ferraro
UFSC
Membro Titular


Profª Drª Marina Isabel Mateus de Almeida
UFPR
Membro Titular


Profª Drª Claudia Turra Pimpão
PUC
Membro Titular

Visto:


Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1587/1562 – Fax (41) 3266-2042 – ppgene@ufpr.br
www.ufpr.br



Agradecimentos

À Professora Doutora Marta Margarete Cestari, minha orientadora e amiga, pelos vários anos de confiança e de ótima convivência no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental. Obrigada por ter acreditado tanto em mim!

À Professora Doutora Helena Cristina da Silva de Assis, que me recebeu tão bem no Laboratório de Toxicologia Aquática. Muito obrigada pela colaboração, ajuda e por sua enorme generosidade!

Ao Professor Dr Cesar Grisólia, por sua importante presença como membro da banca desse trabalho e que enriqueceu essa tese com valiosas sugestões. Muito obrigada!

À Professora Dra. Cláudia Pimpão pelo aceite do convite como membro da banca e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Marcos Vinícius Ferraro e à Profa Dra. Marina Isabel Mateus de Almeida pelas importantes sugestões.

À Profa Dra. Viviane Prodócimo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Roberto Artoni, sempre muito amigo e presente. Muito obrigada!

Aos Professores Doutores Ciro Alberto Oliveira Ribeiro e Luiz Cláudio Fernandez, que me possibilitaram o acesso aos seus laboratórios sempre com ótima receptividade.

Ao Professor Edvaldo Trindade e ao Fernando Guimarães, pela colaboração que resultou no primeiro artigo desta tese.

Aos alunos do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental: Taynah, Laercio, Gustavo, Gabrieli, Giselle e Antônio, pela amizade e ajuda. Obrigada!

À Áurea, pela amizade e grandiosa colaboração no término do trabalho no laboratório.

Aos alunos Zaira, Stéfani, César e Cris do Laboratório de Toxicologia Aquática (Farmacologia) pela ajuda na realização dos biomarcadores bioquímicos e pela amizade.

Aos alunos Flávio e Ju Chiesse do Laboratório de Toxicologia Celular (Biologia Celular) pela valiosa ajuda e amizade.

Aos alunos Axel e Chelin do Laboratório de Neurobiologia (Patologia Básica).

Aos meninos do Laboratório pela ajuda nas coletas: Rafael Balen, Laercio e Gustavo.

À Marli, Seu Josi (Parque Costa), Sr Daniel (Piscicultura Águas Verdes), Raphael Serafini (Epagri/SC), Seu João (Peixes e Peixes) e Piscicultura Girassol pelos peixes utilizados nos experimentos desta tese.

Aos Professores Doutores Marcelo Vicari, Rafael Noletto e Cristina Cortinhas por todo apoio recebido e acima de tudo, pela amizade.

Aos amigos Roger, Shayana, Edi, Letícia, José, Thaís e Felipe, pela amizade. Muito bom saber que tenho vocês na minha vida, mesmo longe, sei que estão sempre presentes.

À minha família que tanto me apoiou durante esse período, especialmente meus pais Paulo e Marly.

Ao meu namorado Jeferson, por todo amor e carinho, sempre! Também pela paciência e pela valiosa ajuda! Muito obrigada!!! Você é muito importante na minha vida!

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

**Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas,
que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim...
e que valeu a pena.**

Mário Quintana

Sumário

Lista de Abreviaturas	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xi
Resumo Geral	xii
Abstract	xiv
Prefácio Geral	xvi
Introdução geral	01
Objetivos	33
Capítulo I - Estabelecimento de condições experimentais para preservar amostras de sangue de peixe para análise com ensaio cometa e citometria de fluxo	34
Abstract	35
Introdução	35
Material e Métodos	36
Resultados e Discussão	38
Referências bibliográficas	41
Capítulo II - Avaliação da toxicidade subcrônica (60 dias) do Fipronil em <i>Rhamdia quelen</i>, <i>Astyanax sp</i> e <i>Danio rerio</i> utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos	46
Resumo	47
Introdução	47
Material e Métodos	50
Resultados.....	53
Discussão	57
Referências bibliográficas	63

Capítulo III - Avaliação da toxicidade subcrônica (30 dias) do nitrato de chumbo em *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos

.....	69
Resumo	70
Introdução	70
Material e Métodos	73
Resultados	76
Discussão	79
Referências bibliográficas	86

Capítulo IV - Avaliação da toxicidade subcrônica (28 dias) do naftaleno em *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos

.....	91
Resumo	92
Introdução	92
Material e Métodos	94
Resultados	97
Discussão	102
Referências bibliográficas	110
Discussão Geral	115
Referências Bibliográficas	122
Anexos	154

Lista de abreviaturas

AchE - Acetilcolinesterase

AMN - Alterações morfológicas nucleares

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BchE - Butirilcolinesterase

CE 50 - concentração da amostra que causa efeito a 50% dos organismos expostos

CENO - Concentração de efeito não observado

CEO - Concentração de efeito observado

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CL 50 - Concentração letal a 50% dos indivíduos

CYP450 - citocromo P450

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

EROD - Etoxiresorufina-*O*-deetilase

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FSB - Soro Bovino Fetal

GSH - Glutathiona reduzida

GST - Glutathiona *S*-transferase

HPA - Hidrocarboneto Policíclico Aromático

IARC - Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer

LPO - Lipoperoxidação

MN - Micronúcleo

PBS - Tampão fosfato salino

WHO - Organização Mundial de Saúde

Lista de Figuras

Introdução geral

Figura 01 - Exemplar de <i>Rhamdia quelen</i>	09
Figura 02 - Exemplar de <i>Astyanax sp</i>	10
Figura 03 - Exemplar de <i>Danio rerio</i>	12
Figura 04 - Estrutura química do fipronil	26
Figura 05 - Estrutura química do naftaleno	31

Capítulo I

Figura 01 - Comparação das respostas do ensaio cometa (escores) de células de sangue para diferentes tempos de incubação (0, 24, 48 e 72 h) e soluções (FBS, PBS e EDTA)	43
Figura 02 – Viabilidade de células com iodeto de propídio. Histogramas indicam células inviáveis deslocadas sob as barras	44

Capítulo II

Figura 01 - Célula com núcleo normal (a) e células com alterações morfológicas nucleares (b-p) observadas nos exemplares de <i>Rhamdia quelen</i> expostos ao fipronil	64
Figura 02 - Biomarcadores Genéticos em <i>R. quelen</i> . (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos (controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil) e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil	64
Figura 03 - Biomarcadores Bioquímicos em <i>Rhamdia quelen</i> . Acetilcolinesterase Cerebral e muscular; Glutathione S-transferase e Lipoperoxidação, nos diferentes grupos (controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil	65

Figura 04 - Célula com núcleo normal (a), célula micronucleada (b) e células com alterações morfológicas nucleares (c-l) observadas nos exemplares de *Astyanax sp* expostos ao fipronil 66

Figura 05 - Biomarcadores Genéticos em *Astyanax sp*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil 66

Figura 06 - Biomarcadores Bioquímicos em *Astyanax sp*. Acetilcolinesterase Cerebral e muscular; Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil 67

Figura 07- Biomarcadores Genéticos e Bioquímicos em *Danio rerio*. Escores obtidos no ensaio cometa com brânquias; atividade da Acetilcolinesterase e da Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil) 68

Capítulo III

Figura 01- Célula com núcleo normal (a), células micronucleadas (b; c) e células com alterações morfológicas nucleares (d-p) observadas nos exemplares de *Rhamdia quelen* expostos ao nitrato de chumbo, sendo d - f células com vacúolos 87

Figura 02 - Biomarcadores Genéticos em *R. quelen*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo 87

Figura 03 - Biomarcadores Bioquímicos em *R. quelen*. Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo 88

Figura 04 - Célula com núcleo normal (a) e células com alterações morfológicas nucleares (b-p) observadas nos exemplares de *Astyanax sp* expostos ao nitrato de chumbo 89

Figura 05 - Biomarcadores Genéticos em *Astyanax sp*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados em *Astyanax sp* nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo 89

Figura 06 - Biomarcadores Bioquímicos em *Astyanax sp*. (Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação) nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo 90

Capítulo IV

Figura 01- Célula com núcleo normal (a), células micronucleadas (b-d) e células com alterações morfológicas nucleares (e-p) observadas nos exemplares de *Rhamdia quelen* expostos ao naftaleno, sendo apresentado em e-h núcleos com vacúolos 111

Figura 02 - Biomarcadores Genéticos em *R. quelen*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno 111

Figura 03 - Biomarcadores Bioquímicos em *R. quelen*. Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno 112

Figura 04 - Célula com núcleo normal (a) e células com alterações morfológicas nucleares (b-p) observadas nos exemplares de *Astyanax sp* expostos ao naftaleno 113

Figura 05 - Biomarcadores Genéticos em *Astyanax sp.* (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno 113

Figura 06 - Biomarcadores Bioquímicos em *Astyanax sp.* Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno 114

Lista de Tabelas

Capítulo1

Tabela 01. Citometria de Fluxo: diferenças entre soluções e diferenças entre tempos

.....45

Resumo geral

Diante da grande diversidade de compostos químicos chegando às águas naturais, é de grande interesse conhecer os efeitos destes nos organismos aquáticos. No Brasil, ainda são poucos os estudos visando estudar os efeitos dos agentes xenobióticos nas espécies endêmicas. Nesse sentido, no presente trabalho, são apresentados os resultados da toxicidade de três compostos químicos (fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno) em duas espécies de peixes nativas: *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp*, além de um bioensaio com a espécie de peixe exótica *Danio rerio* exposto ao fipronil. Para avaliação da toxicidade subcrônica destes compostos, utilizamos biomarcadores genéticos (teste do micronúcleo pisco e ensaio cometa) e bioquímicos (acetilcolinesterase muscular e cerebral, etoxiresorufina-*O*-deetilase, glutatona *S*-transferase e lipoperoxidação). Na exposição ao pesticida fipronil podemos observar que os biomarcadores utilizados apresentaram respostas positivas frente à contaminação, mesmo em concentrações tidas como seguras pela legislação internacional. Em *R. quelen*, a concentração tida como segura pela Comunidade Européia (0,10 µg/l) proporcionou aumento na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, quebras no DNA, aumento da AchE cerebral e a concentração 0,23µg/l (concentração ambientalmente realística) promoveu aumento na atividade da GST. Em *Astyanax sp*, a concentração 0,10 µg/l promoveu quebras no DNA, diminuição da AchE muscular e aumento da GST. Em *D. rerio*, somente a acetilcolinesterase se mostrou alterada frente à contaminação com o fipronil, na concentração 0,23 µg/l. Na exposição das espécies *R. quelen* e *Astyanax sp* ao chumbo inorgânico verificamos que a legislação nacional (Resolução 357, CONAMA 2005) estabelece como valor seguro a concentração 0,01 mg/l, concentração esta capaz de provocar alterações nas duas espécies de peixe nativas (em *R. quelen*, a concentração 0,01 mg/l provou aumento na AchE muscular e inibição da EROD e em *Astyanax sp*, essa concentração provou quebras no DNA, aumento da AchE muscular e inibição da GST). Na exposição das espécies ao naftaleno, evidenciamos que a espécie *Astyanax sp* respondeu melhor à contaminação, apesar de respostas frente à contaminação serem observadas nas duas espécies, em baixas concentrações, em diversos biomarcadores. A concentração 3 mg/l (bastante inferior a concentrações ambientais) provocou, em *R. quelen*, aumento na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, quebras no DNA, aumento na atividade da AchE cerebral, inibição da AchE muscular e diminuição dos

níveis de LPO e em *Astyanax sp* expostos à essa concentração, observamos aumento na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, quebras no DNA (já evidenciado nas concentrações inferiores), diminuição da atividade da AchE muscular (já evidenciado nas concentrações inferiores), aumento de atividade das enzimas de metabolismo EROD e GST e aumento nos níveis de lipoperoxidação. Esses resultados, em conjunto, nos mostram que as espécies de peixes nativas *R. quelen* e *Astyanax sp* podem ser utilizadas para avaliação da toxicidade de compostos químicos em condições laboratoriais, como as utilizadas nesse trabalho e a elevada toxicidade dos compostos químicos testados.

Abstract

Since many different chemical compounds reach natural waters, it is of great interest to know the effects of these compounds in aquatic organisms. Few studies were conducted in Brazil on the effects of xenobiotic agents in endemic species. Therefore, the present study shows the toxicity results of three chemical compounds (fipronil, lead nitrate and naphthalene) in two native fish species: *Rhamdia quelen* and *Astyanax sp*, as well as a bioassay with the exotic fish species *Danio rerio* exposed to fipronil. In order to assess the subchronic toxicity of these compounds, we used genetic (the piscine micronucleus test and comet assay) and biochemical (muscle and brain acetylcholinesterase, ethoxyresorufin-*O*-deethylase, glutathione *S*-transferase and lipoperoxidation) biomarkers. Following the exposure to fipronil we observed that the biomarkers used had positive responses to contamination, even in concentrations considered to be safe by the international legislation. In *R. quelen*, the concentration considered to be safe by the European Community (0.10 µg/l) increased the frequency of micronuclei and nuclear morphology alterations, DNA breaks, increase brain AchE activity, and the concentration of 0.23 µg/l (environmentally realistic concentration) promoted the increase of GST activity. In *Astyanax sp*, the 0.10 µg/l concentration promoted DNA breaks, decrease of muscle AchE activity and increase of GST activity. In *D. rerio*, only the acetylcholinesterase activity was altered because of the contamination with fipronil, in the concentration of 0.23 µg/l. In the exposure of *R. quelen* and *Astyanax SP* species to inorganic lead, we found that the Brazilian legislation (Resolution 357, CONAMA 2005) establishes a concentration of 0.01 mg/l as a safe value. This concentration can cause alterations in the two native fish species, (in *R. quelen*, the concentration of 0.01 mg/l increased the muscle AchE activity and inhibition of EROD, and in *Astyanax sp*, this concentration caused DNA breaks, increase in muscle AchE activity and inhibition of GST). Following the exposure of the species to naphthalene, we found that the *Astyanax sp* species had a better response to contamination, despite the fact that both species responded to contamination, in low concentrations, in several biomarkers. The concentration of 3 mg/l (much lower than environmental concentrations) in *R. quelen* increased the frequency of micronuclei and nuclear morphology alterations, DNA breaks, increase in brain AchE activity, inhibition of m muscle AchE and decrease in the LPO levels, and in *Astyanax sp* exposed to this concentration, we noticed an increase in the frequency of micronuclei and nuclear morphology alterations, DNA breaks (already

reported in lower concentrations), decrease in muscle AchE activity (already reported in lower concentrations), increase in the activity of EROD and GST metabolic enzymes and increase in the lipoperoxidation levels. These combined results show that the native fish species *R. quelen* and *Astyanax sp* can be used in the assessment of the toxicity of chemical compounds in laboratory conditions, such as those used in the present study, and the high toxicity of the tested chemical compounds.

Prefácio Geral

Consideráveis variações interindividuais em resposta a uma injúria ambiental são comumente observadas (LEE; STEINERT, 2003). Como essa variabilidade pode interferir na avaliação de toxicidade, recomenda-se um elevado número de indivíduos na amostra, para promover uma melhor avaliação de risco ambiental (LEMOS et al., 2005). Quando se trabalha em bioensaios ou em biomonitoramento, grande número de amostras é necessário na tentativa de se buscar a homogeneidade da amostra e permitir que se façam afirmações com relativa confiança estatística.

O trabalho apresentado nessa tese foi desenvolvido em séries de bioensaios, cada bioensaio com vários grupos de exposição (mínimo três concentrações do contaminante testado e um grupo controle), sendo cada grupo com pelo menos 15 peixes. Dessa forma, percebe-se o número elevado de amostras gerado.

Diante do problema gerado em relação ao elevado número de amostras a ser processado, o primeiro capítulo dessa tese é um artigo que estabelece um protocolo para preservação de amostras de sangue de peixe para o ensaio cometa. A viabilidade das células foi testada através de citometria de fluxo e a integridade do material genético foi analisada através do ensaio cometa. Os resultados se encontram no capítulo 1 dessa tese.

De posse de um protocolo para preservação de amostras, tiveram início os bioensaios propostos (capítulos 2, 3 e 4). Nestes capítulos, procuramos estudar, respectivamente, os efeitos dos compostos: fipronil (inseticida fenilpirazólico), nitrato de chumbo (chumbo inorgânico) e naftaleno (hidrocarboneto policíclico aromático) nas espécies de peixe nativas *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp.* No capítulo 2, também avaliamos a toxicidade do fipronil na espécie de peixe exótica *Danio rerio*, espécie modelo de peixe em testes ecotoxicológicos.

Nos ensaios de toxicidade, é preferível o uso de organismos endêmicos como sentinelas ambientais em relação à utilização de espécies exóticas. Entretanto, o organismo endêmico escolhido deve ser submetido a ensaios suficientemente sensíveis com a finalidade de ser estabelecido um padrão de resposta aos agentes tóxicos para que este objetivo possa ser alcançado de maneira eficiente (PANDRANGI et al., 1995). Até o momento, poucos são os estudos conduzidos com peixes de água doce da América do Sul para avaliação de toxicidade (WILHELM FILHO et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; RABITTO et al., 2005; RAMSDORF et al., 2009a) e muito menos ainda se conhece a

respeito das respostas biológicas das espécies de peixes endêmicas brasileiras.

A contaminação do ambiente com compostos antropogênicos é um fenômeno amplamente entendido, entretanto, implicações ecotoxicológicas ainda permanecem obscuras, havendo falta de conhecimento sobre as relações entre contaminação ambiental e respostas biológicas. O uso de biomarcadores pode servir de ligação entre a causa e o efeito da contaminação (BUCHELI; FENT, 1995).

Os experimentos foram realizados buscando-se conhecer as respostas das espécies de peixe frente aos diferentes compostos químicos que tiveram sua toxicidade avaliada, através da utilização de diferentes biomarcadores.

O capítulo 2 apresenta os resultados dos biomarcadores testados para avaliação da toxicidade do fipronil (concentrações: 0,05 µg/l; 0,10 µg/l e 0,23 µg/l) de indivíduos das espécies de peixes *Rhamdia quelen*, *Astyanax sp* (ambas nativas; a primeira de fundo e a segunda tida como espécie de coluna d'água) e *Danio rerio* após contaminação subcrônica (60 dias). Nesse capítulo, verificamos que a sensibilidade de *Danio rerio* foi reduzida se comparada às respostas observadas nas espécies nativas, tendo em vista que a espécie exótica respondeu à contaminação em somente um biomarcador enquanto as espécies nativas tiveram vários biomarcadores respondendo à exposição. Dessa forma, optamos por não utilizar *D. rerio* nos outros bioensaios frente aos demais contaminantes.

O capítulo 3 apresenta os resultados dos biomarcadores testados para avaliação da toxicidade do nitrato de chumbo (0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l) de indivíduos das espécies de peixes *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* após contaminação subcrônica (30 dias).

O capítulo 4 apresenta os resultados dos biomarcadores testados para avaliação da toxicidade do naftaleno (0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l) de indivíduos das espécies de peixes *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* após contaminação subcrônica (28 dias). Devido à baixa solubilidade do naftaleno em água, foi necessário um grupo de controle com etanol.

As exposições aos contaminantes foram simultâneas, com os grupos de contaminação sendo realizados no mesmo período de tempo. Os biomarcadores para avaliação da toxicidade dos compostos foram: teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa (biomarcadores genéticos), acetilcolinesterase cerebral e muscular (biomarcador bioquímico de neurotoxicidade), etoxiresorufina-*O*-deetilase e glutathione *S*-transferase (biomarcadores bioquímicos de biotransformação, fases I e II, respectivamente) e lipoperoxidação (biomarcador bioquímico de estresse oxidativo) nas espécies *R. quelen* e *Astyanax sp*. Com *Danio rerio*, no experimento com o fipronil, os biomarcadores

analisados foram: ensaio cometa com brânquias, acetilcolinesterase, lipoperoxidação e glutathione *S*-transferase, em extrato da fração microssomal obtido a partir de homogeneização do corpo do peixe. O método de contaminação foi semi-estático, com reposição de 1/3 da água e do contaminante a cada 72 h, em todos os bioensaios.

Introdução Geral

1. A problemática da contaminação ambiental

O ambiente aquático está exposto a processos de poluição causados pelas enormes variedade e quantidade de substâncias químicas que ingressam nele. Estas substâncias, que podem ser produzidas pelo homem ou de origem natural, são chamadas de “xenobióticos” (substância estranha ao ambiente) e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento (LIVINGSTONE, 1993; 1998). A Sociedade Americana de Química demonstrou que há cerca de 10 milhões de substâncias químicas mencionadas na literatura científica. Estima-se que cerca de 70 mil são de uso cotidiano, sendo que de mil a duas mil novas substâncias são adicionadas a essa lista anualmente. Apenas duas mil dessas substâncias têm seus efeitos tóxicos conhecidos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A contaminação do ambiente com compostos antropogênicos é um fenômeno amplamente entendido e ocorre tanto de origens pontuais como difusas. Implicações ecotoxicológicas, entretanto, ainda permanecem obscuras, pois falta conhecimento sobre as relações entre contaminação ambiental e respostas biológicas (BUCHELI; FENT, 1995).

Estudos sobre a toxicidade de substâncias e elementos químicos se revestem, assim, de grande importância, pois permitem determinar as respostas de um dado organismo a esta contaminação, permitindo avaliar o impacto e o efeito sobre células, tecidos e órgãos bem como inferir sobre possíveis perturbações metabólicas (PANDRANGI et al., 1995). Os padrões de acumulação de xenobióticos são diferentes para distintos organismos e dependem do balanço entre a taxa de assimilação e as taxas de metabolização e eliminação dos compostos químicos. Existem diferenças nas formas de metabolizar os xenobióticos, portanto, existe uma necessidade de se detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos, e não somente avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais.

Ferramentas convencionais de monitoramento do ambiente podem avaliar os níveis de contaminação, bem como o estado de saúde ambiental, mas eles dificilmente servem como ligação entre eles. O uso de biomarcadores, de outro modo, pode servir de ligação entre a causa e o efeito da contaminação (BUCHELI; FENT, 1995). A necessidade de avaliar o impacto dos poluentes em organismos origina estudos e desenvolvimento de biomarcadores genéticos, moleculares, bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, que detectem efeitos biológicos nos organismos.

1.1 Biomonitoramento, bioensaio, biotransformação, bioacumulação, bioindicador e biomonitor

Biomonitoramento aquático consiste na análise periódica de corpos de água coletando e identificando organismos indicadores da qualidade sanitária ou ecológica da água. É a avaliação contínua da qualidade de águas e efluentes por meio de biomonitores. Enquanto o biomonitoramento fornece uma avaliação da qualidade do corpo de água a longo prazo, o monitoramento da água por meio de parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos fornece resultados pontuais, que representam a situação do corpo d' água no momento da amostragem (KNIE; LOPES, 2004).

O biomonitoramento refere-se ao acompanhamento dos efeitos obtidos diretamente do local analisado e permite observar a real situação do ambiente e dos organismos impactados, e as relações dos xenobióticos entre si e os fatores físicos aos quais os organismos estão sujeitos. Permite avaliação mais ampla das condições naturais, porém as variáveis do ambiente dificultam a interpretação dos efeitos causados pelos contaminantes (RAMSDORF, 2007).

Bioensaios são ensaios realizados em laboratório sob condições-padrão, utilizam organismos vivos (bactérias, algas, microcrustáceos, moluscos, peixes e outros) ou partes deles (células, tecidos e outros) para avaliar a toxicidade de águas residuárias, de efluentes industriais ou de substâncias químicas. O efeito encontrado pode ser letal, inibidor de crescimento ou da reprodução, modificador do comportamento, entre outros (KNIE; LOPES, 2004). São utilizados para obtenção de dados e padronização de metodologias e permitem prever e/ou avaliar efeitos de um dado xenobiótico, em determinada concentração ou dosagem, em determinada espécie (RAMSDORF, 2007).

Bioensaios oferecem algumas vantagens como poder comparar a toxicidade relativa de químicos específicos ou efluentes específicos, entretanto, testes de toxicidade têm sérias limitações para monitoramento biológico, pois não levam em conta o efeito de especificação química no ambiente, cinética e sorção de químicos no sedimento, acumulação através da cadeia trófica e modos de ação dos tóxicos que não podem ter seus efeitos medidos em curto tempo (VAN DER OOST, BEYER; VERMEULEN, 2003).

Através de bioensaios, a toxicidade de águas e sedimentos pode ser testada usando sistemas biológicos como bactérias, leveduras e plantas assim como organismos aquáticos, como anfíbios, moluscos e peixes (MINISSI; CICCOTINI; RIZZONI, 1996). Quando se trabalha em bioensaios com peixes, os métodos de exposição aos agentes tóxicos podem ser

por imersão (quando os poluentes encontram-se dissolvidos na água), injeção intraperitoneal ou via trófica, na qual os animais recebem o contaminante através da alimentação. Na contaminação por imersão, os modos de exposição podem ser: estático, semi-estático e dinâmico (KNIE; LOPES, 2004).

O método mais aplicado é o teste estático. Neste, a amostra não é trocada e os organismos-teste permanecem expostos à mesma solução-teste durante o período de ensaio. Dependendo da duração do teste e da composição da amostra, podem ocorrer mudanças químicas. Avaliando-se a relação custo-benefício, em geral, aceitam-se pequenas alterações na amostra. O método semi-estático é muito empregado em testes com substâncias ou amostras ambientais pouco estáveis. É um método também adequado para amostras contendo substâncias voláteis ou de baixa solubilidade. Nesse método de exposição, a solução teste é substituída em intervalos definidos por outra solução com as mesmas características. Nos sistemas dinâmicos os organismos são expostos a um fluxo contínuo da amostra. O método dinâmico é adequado na medição de meios instáveis (como substâncias voláteis), de amostras com substâncias de baixa solubilidade e para questões de bioacumulação e biotransformação, porém, apresenta custo bastante elevado para sua realização (KNIE; LOPES, 2004).

Um ensaio de toxicidade é classificado pelo tempo de exposição, pela concentração utilizada no ensaio e o efeito observado. Em geral, são considerados ensaios de toxicidade aguda os ensaios que avaliam doses elevadas de contaminantes por um curto período de tempo de exposição, com a duração desses ensaios variando normalmente de 24 a 96 horas. Nestes ensaios, o efeito avaliado é a morte dos organismos-teste expostos. Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda são expressos através da CE50 (concentração da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos) (ALEGRE, 2009). Os testes agudos detectam os efeitos imediatos, geralmente irreparáveis (KNIE; LOPES, 2004). Geralmente, trata-se da administração de uma única dose ou exposições múltiplas em 24 horas. Considera-se o aparecimento de efeito num período de até 14 dias (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

As definições de toxicidade subaguda e subcrônica são controversas por conta do intervalo de tempo que as caracteriza. Geralmente, envolvem o estudo dos efeitos adversos decorrentes da exposição à dose/concentrações múltiplas do agente tóxico durante períodos que não excedem 10% da vida do animal. Esses estudos devem fornecer informações sobre os principais efeitos tóxicos dos compostos, os órgãos-alvo afetados e a severidade dos efeitos após exposições repetidas, além de permitir a inferência das doses a serem utilizadas nos estudos de toxicidade crônica (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Os ensaios de avaliação de toxicidade crônica são os que avaliam os efeitos de concentrações inferiores de contaminantes por um prolongado período de exposição. Esses ensaios abrangem parte significativa do ciclo de vida do organismo, resultando em mudanças na taxa de crescimento e reprodução (ROMANELLI, 2004). Com os testes crônicos, analisam-se danos que se mostram após um tempo maior, às vezes somente após várias gerações (KNIE; LOPES, 2004). Em ensaios de toxicidade para estudo de efeitos crônicos, os resultados podem ser expressos em CENO (concentração de efeito não observado), cuja definição segundo a Norma NBR13373 (2005) é a “maior concentração testada da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução nas condições de ensaio”, e CEO (concentração de efeito observado), que representa a menor concentração onde se observa tal efeito (ALEGRE, 2009).

Quando se analisa a toxicidade de determinada substância em condições laboratoriais, não podemos esquecer que essa substância, assim como no ambiente, sofre biotransformação. Biotransformação ou metabolismo pode ser definido como a conversão de um composto xenobiótico catalisada por enzimas que o tornam mais solúvel em água, podendo desta forma ser excretado pela célula ou organismo mais facilmente que o composto original. Este processo frequentemente envolve enzimas que possuem relativamente baixa afinidade pelo substrato se comparadas com as enzimas envolvidas no metabolismo de compostos constitutivos normais das células (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

A biotransformação ocorre por meio de processos bioquímicos nos quais compostos hidrofóbicos de compostos de natureza endógena e exógena sofrem passos em direção a torná-los mais hidrofílicos, promovendo/facilitando assim seu metabolismo (MATSUO et al., 2008). O metabolismo visa transformar os compostos químicos em substâncias mais polares e, em geral, aumentar seu tamanho e peso molecular, facilitando a excreção e eliminação do organismo. Essas modificações estruturais levam à diminuição da meia-vida biológica, diminuição do armazenamento da substância no organismo, além da modificação na atividade biológica. Entretanto, em alguns casos, a biotransformação pode também produzir compostos de maior toxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Freqüentemente, tais processos de biotransformação estão categorizados dentro de reações de fase I ou fase II, embora alguns compostos sofram apenas um tipo de reação de biotransformação. As reações de fase I envolvem principalmente hidrólises, oxidação e reações de redução, por adição ou exposição de grupos funcionais (hidroxil, sulfidril, carboxil, amino), e as de fase II, reações sintéticas ou de conjugação (metilação, glucoronização, sulfação) para posterior aumento da solubilidade (MATSUO et al., 2008).

Bioacumulação é o fenômeno, bem como o processo, em que certos isótopos, elementos ou ligas estão presentes nos organismos (ou são ingeridos) em concentrações mais altas que num determinado compartimento do meio ambiente, incluindo também a alimentação. Não define por qual caminho a substância entra no organismo: se diretamente do meio (água, ar, solo) através de epitélios receptores, ou seja, pelas raízes, folhas, pulmão ou pele ou no caso de animais, pelos alimentos contaminados. A bioacumulação pode ser entendida como um termo superior, que engloba a bioconcentração (absorção direta pela pele, guelra ou pulmão) e a biomagnificação (absorção por meio da ingestão de água ou alimentos) (KNIE; LOPES, 2004).

A biomagnificação é o aumento da concentração de resíduos químicos de organismos na parte mais alta da cadeia alimentar, primariamente como o resultado de acumulação em função da dieta dos mesmos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Esses compostos, por não serem biodegradáveis, permanecem nos ecossistemas e espalham-se pelos diferentes níveis tróficos, interferindo no equilíbrio do meio ambiente (KNIE; LOPES, 2004). Muitas substâncias tóxicas como metais e compostos orgânicos podem ser transferidos dos tecidos dos organismos para os seus predadores e chegar a concentrações de maiores magnitudes em níveis tróficos superiores (DE LEMOS; TERRA, 2003).

Bioindicadores ou indicadores biológicos são seres vivos utilizados em bioensaios, para determinação do efeito biológico de alguma substância, fator ou condição. Esses indicadores são estudados no exame biológico da água, para caracterizar o estado de poluição. Bioindicador também pode ser definido como a espécie cuja presença/ausência pode ser característica das condições ambientais em um habitat ou região em particular; entretanto, a composição das espécies ou a abundância relativa de seus componentes individuais da população ou comunidade são usualmente consideradas em índice mais confiável da qualidade da água (KNIE; LOPES, 2004).

Biomonitores são os organismos expostos à contaminação no ambiente natural, normalmente, e sua análise periódica origina um biomonitoramento. Existem biomonitores com as mais diferentes espécies, como algas, bactérias, moluscos e peixes. Os biomonitores são utilizados principalmente como sistemas de alerta em estações de controle da qualidade da água e efluentes (KNIE; LOPES, 2004).

Dentre os principais organismos utilizados como biomonitores estão espécies de moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos (COTELLE; FERARD, 1999) e algas (AOYAMA; IWAHORI; MIYATA, 2003). Dentro destas, o amplo uso de peixes é explicado pela sua maneira similar aos grandes vertebrados de responder a tóxicos. Peixes também indicam o

potencial de exposição de populações humanas a tóxicos químicos, sendo que também são os principais vetores de transferência de contaminantes para humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). A alimentação é a maneira mais comum para exposição de populações humanas a tóxicos químicos, sendo peixes e crustáceos reconhecidamente os maiores vetores na transferência de contaminantes aos humanos. Além disso, os peixes, assim como mamíferos, sofrem bioacumulação, são capazes de responder a agentes químicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450 (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

O uso de peixes em laboratório apresenta a vantagem da fácil obtenção e manutenção destes animais em laboratório. Os poluentes mais comumente encontrados em corpos de água são: metais, defensivos agrícolas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos derivados de petróleo ou de origem sintética, detergentes e outros componentes dos esgotos domésticos e industriais e compostos ácidos (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007) sendo, portanto estas as classes de compostos químicos mais amplamente utilizados em bioensaios.

1.2 Bioindicadores

Bioindicadores ou indicadores biológicos são seres vivos utilizados em bioensaios, para determinação do efeito biológico de alguma substância, fator ou condição (KNIE; LOPES, 2004).

A resposta tóxica varia significativamente entre as espécies, assim, esse fator deve ser levado em consideração quando se avalia a toxicidade de um composto. Em termos ambientais, diferentes espécies podem ser expostas a uma dada substância e se comportarem de maneiras distintas. Essas diferenças em toxicidade podem ser explicadas pelas diferenças na biotransformação (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Ao buscar uma espécie para a utilização em testes de toxicidade é preciso observar alguns princípios básicos. O primeiro deles diz respeito à sua sensibilidade; é preciso que a espécie seja bastante sensível a uma diversidade de agentes químicos. Sua sensibilidade deve ser relativamente constante, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos, garantindo, assim, boas repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Para tanto, são necessários conhecimentos prévios da biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo quanto para a realização dos testes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Outro critério é a disponibilidade de organismos; espécies presentes em épocas

restritas e em pequeno número devem ser desconsideradas em favor daquelas abundantes e disponíveis ao longo do ano. O uso de espécie com ampla distribuição geográfica também é bastante recomendável. Contudo, há exemplos como o dos peixes *Geophagus brasiliensis* e *Tilapia melanopleura*, amplamente distribuídos e com densidade populacional bastante elevada, que aparentemente não são adequados devido à resistência a alguns agentes químicos. Por outro lado, analisando os dados da CETESB (1980), verifica-se que peixes caracídeos, como lambaris, são freqüentemente mais sensíveis a agentes químicos, além de serem amplamente distribuídos no Brasil (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

As espécies utilizadas nos estudos de avaliação de risco devem ser sensíveis, ecologicamente significativas, amplamente distribuídas, preferencialmente de importância econômica, disponíveis durante o ano todo e ter ciclo biológico curto, e as condições de ensaio devem ser representativas do ambiente aquático (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Além da escolha de organismos representativos do ambiente aquático, também é importante, na avaliação de toxicidade de determinado poluente utilizar organismos de níveis tróficos diferentes, tendo em vista que organismos de níveis tróficos diferentes podem ter sensibilidades distintas. Dados da CETESB (1980) a respeito dos valores da toxicidade aguda ao dicromato de potássio (mostrada através da CL 50, concentração letal a 50% dos indivíduos), em período de 96 horas, mostram diferenças de resposta entre as espécies de peixes, sendo as espécies forrageiras (como *Danio rerio*, *Hemigrammus marginatus* e *Cheirodon notomelas*) mais sensíveis em relação às espécies detritívoras *Geophagus brasiliensis*, *Poecilia reticulata* e *Colossoma mitrei* (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Dessa forma, tornam-se necessários mais estudos a fim de se verificar quais espécies podem ser usadas em biomonitoramento e/ou bioensaios. Algumas espécies de peixes como *Phoxinus phoxinus* e *Genyonemus lineatus*, apresentam falta de sensibilidade a diversos poluentes, como destacaram RODRIGUEZ-CEA; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ (2003).

Nos ensaios de toxicidade, é preferível o uso de organismos endêmicos como sentinelas ambientais em relação à utilização de espécies exóticas. O organismo endêmico escolhido deve ser submetido a ensaios suficientemente sensíveis com a finalidade de ser estabelecido um padrão de resposta aos agentes tóxicos para que este objetivo possa ser alcançado de maneira eficiente (PANDRANGI et al., 1995).

Até o momento, poucos são os estudos conduzidos com peixes de água doce da América do Sul para avaliação de toxicidade (WILHELM FILHO et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; RABITTO et al., 2005; RAMSDORF et al., 2009a) e muito menos ainda se conhece a respeito das respostas biológicas das espécies de peixes endêmicas brasileiras.

1.2.1 *Rhamdia quelen*

Rhamdia quelen ou jundiá (Figura 01) é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, sendo encontrado do sul do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma das espécies nativas mais promissoras para o cultivo, despertando interesse de muitos piscicultores, pois apresenta rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo em criações intensivas, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES et al., 2000). É uma espécie resistente ao inverno e apresenta rápido crescimento no verão, importante para aquicultura de clima temperado e subtropical (BARCELLOS et al., 2003).

Pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe Osteichthyes, Série Teleostei, Ordem Siluriformes e Família Heptapteridae (NELSON, 2006). Pode atingir 50 cm de comprimento e 3 kg de peso; possuem hábito noturno e são euritérmicos. Possui dois picos reprodutivos por ano (verão e primavera), com a maturidade sexual da espécie sendo atingida no primeiro ano de vida. Os adultos da espécie são onívoros no ambiente natural, alimentam-se de peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. São generalistas no que diz respeito à escolha do alimento (GOMES et al., 2000), característica essa que contribui para sua adaptação ao alimento artificial, e assim, para sua domesticação. Esse fato desperta bastante o interesse por parte de pesquisadores e produtores. Essas características vêm possibilitando a inclusão de *Rhamdia quelen* na lista de espécies de peixes mais criadas comercialmente no Brasil (CARNEIRO; MIKOS, 2005).

O jundiá é um peixe de couro, cuja coloração varia de marrom-avermelhado claro a cinza, com a parte ventral do corpo mais clara. A coloração do corpo pode variar de acordo com o ambiente em que se encontra, pois, quando colocado em ambientes claros, o jundiá tende a ficar mais claro e o inverso ocorre quando este peixe se encontra em um ambiente escuro. Apresenta barbilhões localizados junto à boca, que provavelmente possuem receptores para ajudar na localização do alimento e na percepção da qualidade da água (BALDISSEROTTO; NETO, 2004).

O jundiá vive em lagos e poços fundos dos rios e tem preferência por ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, próximo às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos, de onde saem à noite para procurar alimento (BALDISSEROTTO; NETO, 2004). Uma acentuada aversão à luz e busca por locais escuros foi observada em experimentos realizados com larvas e alevinos desta espécie em cativeiro (PIAIA; TOWNSEND; BALDISSEROTTO, 1999).



Figura 01- Exemplar de *Rhamdia quelen* (Fonte: FISHBASE, 2010)

1.2.2 *Astyanax* sp

O gênero *Astyanax* (Figura 02) foi inicialmente proposto por Baird & Girard (1854) e a primeira revisão mais completa deste gênero foi realizada por EIGENMANN (1921) e EIGENMANN (1927), que validou 74 espécies e subespécies. Posteriormente, GÈRY (1977) enumerou uma lista de 62 espécies e subespécies em água doce do Brasil. A revisão mais recente, realizada por LIMA et al., (2003) cita 86 espécies e as poucas subespécies existentes foram elevadas a espécies.

Pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe Osteichthyes, Série Teleostei, Superordem Osthariophysi, Subsérie Characiphysi, Ordem Characiformes, Família Characidae (FINK; FINK, 1981). Dentro da família Characidae, a subfamília Tetragonopterinae é um grupo bastante diversificado, com muitos gêneros e espécies, podendo ser encontrada ao longo da América do Sul e da América Central. Os tetragonopteríneos mais frequentes nos riachos do sudeste do Brasil são espécies dos gêneros *Astyanax*, *Bryconamericus*, *Deuterodon*, *Hollandichthys*, *Moenkhausia*, *Piabina*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* (GODOY, 1975; BUCKUP, 1999).

Os tetragonopteríneos são conhecidos popularmente como lambaris na região Sul e como piabas na região Central (BRITSKI, 1972), sendo a maioria das espécies onívora com hábitos de forrageamento muito ativos (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988).

Lambaris são amplamente utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Por outro lado, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Além disso, são considerados

transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores, como os piscívoros. Espécies do gênero *Astyanax* têm sido consideradas, em grande parte dos estudos já realizados, como zooplancívoras, insetívoras e onívoras, tendo papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas (SANTOS, 1981).

Muitas espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente similares e sua separação tem sido historicamente difícil (MELO, 2001), formando um complexo do ponto de vista taxonômico (FERNANDES; MARTINS-SANTOS, 2004). Dessa forma, e também devido às suas características biológicas e citogenéticas, esse gênero tem recebido, atenção especial por parte de alguns pesquisadores (MORELLI et al., 1983; MOREIRA-FILHO, 1989).



Figura 02- Exemplar de *Astyanax sp* (Fonte: FISHBASE, 2010)

1.2.3 *Danio rerio*

Danio rerio, popularmente conhecido como peixe zebra ou paulistinha (Figura 03) apresenta padrão de coloração característico, com listras pretas que o fazem semelhante a uma zebra. Originário da Ásia e habita rios do norte da Índia, Paquistão e Nepal. É uma espécie facilmente mantida em condições controladas de laboratório (temperatura da água em torno de $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pH $7,0 \pm 0,2$ e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro), para sua criação não requer muitos cuidados e é facilmente encontrado em lojas comerciais. Os adultos chegam ao comprimento de 4 a 5 centímetros e são rápidos nadadores. Atingem maturidade sexual com aproximadamente 12 semanas e o pico de desova ocorre de 5 a 10 dias, com cada fêmea produzindo, em média, 150 a 400 ovos/dia. Os ovos são pequenos, transparentes e fertilizados

externamente, com a eclosão dos ovos ocorrendo entre 48 e 96 horas após a fertilização (WESTERFIELD, 2000).

Pertence à seguinte divisão taxonômica: Classe Osteichthyes, Série Teleostei, Ordem Cypriniformes, Família Cyprinidae (NELSON, 2006). Na última década, o peixe zebra transformou-se em um organismo modelo proeminente nos campos da biomedicina, ecotoxicologia e genética (BOPP; LETTIERI, 2007).

Segundo SUMANAS e LIN (2004), algumas das características que o tornam um modelo altamente utilizável incluem:

- Tamanho relativamente pequeno dos adultos (cerca de 4 cm de comprimento), baixo custo e acondicionados em grandes quantidades em pequeno espaço, o que os torna facilmente mantidos em condições controladas de laboratório;
- Os ovos são fertilizados externamente, produzidos regularmente em grande quantidade, além de não serem adesivos;
- Os embriões são transparentes, pequenos, contém um pequeno número de células e se desenvolvem rápido, sendo que, cinco dias após a fertilização a larva já se apresenta formada;
- Relativo curto período de geração, de aproximadamente 3 meses;
- São vertebrados, o que os aproxima ainda mais do ser humano quando comparado com os modelos mais utilizados de invertebrados como insetos (*Drosophila*) e nematóides (*Caenorhabditis elegans*). O desenvolvimento do peixe zebra é muito similar à embriogênese de vertebrados superiores, incluindo seres humanos, mas, ao contrário dos mamíferos, o ovo é fertilizado externamente e é transparente.

Assim, experimentos com peixe-zebra são significativamente fáceis, rápidos e baratos se comparados com aqueles realizados em camundongos e ratos, os principais modelos experimentais adotados quando se objetiva a comparação com mamíferos (BRESOLIN, 2005).

Danio rerio tem apresentado um interesse crescente em pesquisas nos campos da toxicologia e da ecotoxicologia, como um organismo vertebrado não-mamífero na avaliação de risco e na regulamentação; por exemplo, o embrião de peixe zebra é particularmente indicado para ensaios ecotoxicológicos. O seqüenciamento completo do seu genoma impulsionou para que a comunidade científica reconhecesse o peixe zebra como principal organismo vertebrado nos campos acima mencionados (BOPP; MINUZZO; LETTIERI, 2006).



Figura 03- Exemplar de *Danio rerio* (Fonte: FISBASE, 2010)

1.3 Biomarcadores

Diversos estudos empregam biomarcadores na avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas no ambiente aquático. Muitas definições têm sido propostas para o termo “biomarcador”. Um biomarcador, num sentido amplo, pode ser definido como uma resposta mensurável em qualquer nível de organização biológica que pode ser relacionada com o impacto por contaminantes (BUCHELI; FENT, 1995). LIVINGSTONE (1993) considera como biomarcadores fluídos corpóreos, células ou tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes. Esse autor também considera como biomarcadores as respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos. Existem assim biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes (LIVINGSTONE, 1993).

Este termo pode ser usado, de forma geral, para qualquer medida que reflita uma interação entre um sistema biológico e um dano potencial, que pode ser químico, físico ou biológico (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos define biomarcador como uma alteração induzida por xenobiótico em componentes ou processos, estruturas ou funções celulares ou bioquímicas que podem ser medidas em um sistema biológico ou amostra (SANTOS, 2004).

VAN DER OOST, BEYER e VERMEULEN (2003), em revisão sobre biomarcadores, apresentaram os biomarcadores subdivididos em: - biomarcador de exposição: detecta e quantifica a presença do xenobiótico, de seus metabólitos ou de sua interação com componentes moleculares ou celulares em compartimentos do organismo; infere exposição prévia e fornece os índices de bioacumulação da biota, estes determinados por métodos

bioquímicos e de química analítica; - biomarcador de efeito: parâmetros bioquímicos ou fisiológicos mensuráveis que correspondam a alterações em níveis molecular, celular ou tecidual que permitam inferir efeito adverso, prejudicial ao operar normal do organismo saudável, efeito pré-clínico, subletal ou até letal; - biomarcador de susceptibilidade: indica a habilidade inerente ou adquirida por um organismo de responder à exposição a um xenobiótico; elucida variações no grau de resposta diferencial entre organismos e demonstra a tolerância fisiológica adquirida ou controlada por expressão gênica hereditária.

Os biomarcadores são importantes, pois podem nos dar mais informações dos efeitos biológicos de um determinado poluente do que sua mera quantificação; bons biomarcadores são indicadores sensíveis de respostas biológicas precoces e podem ser usados para avaliar o estado de saúde de um organismo e obter sinais precoces de risco ambiental (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

A escolha apropriada do biomarcador para a detecção e o monitoramento de exposição e efeitos requer a consideração de uma série de fatores (LIVINGSTONE, 1985). São sugeridos como critérios para a seleção: facilidade de medida, permitindo a quantificação de múltiplos indivíduos; resposta-dose ou tempo-dependente ao contaminante, de modo a poder determinar a magnitude da exposição ou efeito; compreensão e especificação de limites de variabilidade devida a outros fatores (sexo, idade, peso, manuseio e estação do ano, temperatura, salinidade, entre outros), que não a ação do contaminante em estudo; significância biológica, ou seja, o biomarcador deve estar relacionado a processos biológicos-chave (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Um estudo de toxicologia ambiental, seja ele biomonitoramento ou bioensaio, é considerado ideal quando utiliza um conjunto de biomarcadores, fornecendo uma visão mais ampla dos efeitos tóxicos de contaminantes no organismo estudado (HINTON et al., 1992). Entre os diferentes tipos de biomarcadores destacam-se os parâmetros hematológicos, imunológicos, reprodutivos, endócrinos, fisiológicos, morfológicos, enzimáticos, genéticos entre outros (PEAKALL, 1994).

1.3.1 Biomarcadores Genéticos

Devido às implicações ecológicas diretas associadas com genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos genéticos são de grande interesse em estudos ambientais (NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996). A função primária dos testes de toxicologia genética é

investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas ou germinativas (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Algumas das consequências dos tóxicos em organismos aquáticos incluem defeitos de hereditariedade devido a mutações e efeitos teratogênicos em células germinativas; declínio populacional; efeitos carcinogênicos (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998); redução de crescimento; desenvolvimento anormal e redução da sobrevivência de embriões, larvas e adultos (LEE; STEINERT, 2003). Em humanos são citados, além da toxicidade que pode levar ao câncer, doenças como aterosclerose, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce (GROVER; KAUR, 1999).

O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula pode ser investigado em muitos organismos sob diferentes condições (McCARTHY; SHUGART, 1990). Muitos biomarcadores têm sido utilizados como ferramentas para a detecção de exposição e para avaliação dos efeitos de poluição genotóxica. Dentre os principais biomarcadores genéticos, podemos citar a avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, análise da frequência de trocas de cromátides irmãs, formação de adutos de DNA, quebras no DNA avaliadas pelo ensaio cometa e a medição da frequência de micronúcleo e anormalidades morfológicas nucleares (BOMBAIL et al., 2001).

1.3.1.1 Teste do Micronúcleo Píscico

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por SCHMID (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptado por HOOFTMAN e de RAAT (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Essa modificação originou o que hoje conhecemos por Teste do Micronúcleo Píscico (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL et al., 2001).

Apesar de não se conhecer precisamente a origem das alterações morfológicas nucleares em peixes, a presença destas já foi relacionada com a presença de tóxicos na água em diversos trabalhos (HOOFTMAN; de RAAT, 1982; HAYASHI et al., 1998; AYLLON;

GARCIA-VAZQUEZ, 2000; BOMBAIL et al., 2001; ABUL FARAH et al., 2003; GUILHERME et al., 2008, entre outros)

O teste de micronúcleo em peixes apresenta potencial para detectar a presença de substâncias clastogênicas no meio aquoso. Uma vez que os peixes teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos nestas células pode ser averiguada e usada como medida da atividade clastogênica de substâncias no ambiente aquático (AL-SABTI; METCALFE, 1995). A avaliação das anomalias nucleares e os micronúcleos são ensaios bastante utilizados para investigação de efeitos genotóxicos de poluentes ambientais em peixes (AL-SABTI, 1986).

Dentre vários ensaios de genotoxicidade existentes, o teste do micronúcleo tem sido aplicado com sucesso por se tratar de um ensaio simples, seguro e sensível, e por não depender da característica cariotípica do animal em estudo (MINISSI; CICCOTINI; RIZZONI, 1996). Quando eritrócitos de peixes são usados também não há consumo excessivo de tempo e não há sofrimento dos animais, tornando essa uma técnica amplamente utilizada em investigações de mutagênese com causas ambientais (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste do micronúcleo písceo tem sido usado para estimar o nível de exposição a contaminantes em muitas pesquisas desde os anos 80 tanto em condições laboratoriais como no campo (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). O consenso geral é que a contagem de micronúcleos durante a interfase é tecnicamente mais fácil e rápida quando comparada à contagem de aberrações cromossômicas durante a metáfase (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Nem todos os agentes que induzem micronúcleo são clastogênicos. Micronúcleos podem ser formados por uma não disjunção como um resultado de exposição a um “veneno de fuso” (HEDDLE et al., 1991), no entanto, os mecanismos pelos quais os poluentes induzem os micronúcleos em células de peixes ainda não são totalmente conhecidos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O ensaio, entretanto, não é capaz de detectar as não disjunções mitóticas se estas não levarem à perda de cromossomos na anáfase, e também não detecta aberrações cromossômicas causadas por rearranjos, tais como translocações ou inversões, se estas não originarem fragmentos acêntricos. Desta forma, o teste nestes casos apresenta uma subestimativa e falta de sensibilidade (METCALFE, 1989).

1.3.1.2 Ensaio Cometa

Nos últimos anos tem crescido o interesse científico no ensaio cometa ou eletroforese em gel para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). O ensaio investiga danos no DNA (simples e dupla-fita) ao nível celular individual através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH et al., 1988).

Esse ensaio é uma ferramenta interessante para monitoramentos na demonstração de genotoxicidade de exposições e para investigar os impactos na integridade do dano no DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental. Nesse sentido, três principais vantagens foram identificadas: (i) qualquer tipo de tecido com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostra, (iii) o ensaio é rápido, sensível e barato. O consenso geral atual é que o ensaio é simples, rápido e sensível. Contudo, uma das maiores críticas da técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não apresenta dano migrará de forma homogênea formando um círculo e DNA que apresenta dano, com fragmentos de diversos tamanhos, migrará de forma diferente durante a eletroforese, com os fragmentos menores migrando mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores, originando a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL et al., 2001).

Ao contrário de outros tipos de ensaio, como o dos micronúcleos, de aberrações cromossômicas ou de trocas de cromátides irmãs, que necessitam de células em proliferação para sua realização, o ensaio cometa não necessita desta condição, podendo ser utilizado em, virtualmente, qualquer tipo de célula, desde que nucleada (PANDRANGI et al., 1995).

Diversas publicações comprovam que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de mutagênicos em peixes. A resposta pode, é claro, depender das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula, do mutagênico e da duração da exposição (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). Antes destes aspectos, devem-se considerar os mecanismos de reparo próprios do DNA que podem estar atuando antes da análise do material. Porém, que sob esse aspecto de reparo do DNA, cabe aqui ressaltar que os organismos aquáticos têm sistemas de reparo de DNA mais lentos que os mamíferos (ESPINA; WEISS, 1995).

O ensaio cometa é habitualmente realizado com eritrócitos, pois estes são facilmente obtidos por métodos não destrutivos e não necessitam do passo adicional de isolamento, porém outros tecidos também têm sido testados, pois os efeitos de genotoxicidade de determinados contaminantes podem ser tecido-específicos. O sangue também apresenta a vantagem de apresentar em sua composição aproximadamente 97% de eritrócitos nucleados e apenas cerca de 3% de leucócitos, o que confere alta homogeneidade ao tecido (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Além do sangue, os tecidos mais pesquisados são fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo, brânquias, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa, e rim, tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

Como o ensaio cometa analisa as células individualmente, há certa limitação na desagregação do tecido. As células devem ser separadas por processos de fragmentação ou através da aplicação de enzimas. Estas células devem ser convenientemente separadas por meios que não as danifiquem, mas que permitam sua individualização. Qualquer que seja o meio a ser utilizado, todo o processamento das células deve obrigatoriamente ser executado sem que danos adicionais ao DNA possam ocorrer (FERRARO, 2003). No caso de células sangüíneas estas podem ser diluídas em soro bovino fetal ou em solução fisiológica, porém RAMSDORF et al (2009b) recomenda armazenamento do sangue em soro bovino fetal, por 48 horas, em ausência de luz e sob refrigeração.

1.3.2 Biomarcadores Bioquímicos

Alterações bioquímicas ou moleculares são usualmente as primeiras respostas detectadas e quantificadas frente à variação ambiental, incluindo alterações no ambiente químico (BUCHELI; FENT, 1995). Alterações em sistemas bioquímicos são freqüentemente mais sensíveis indicadores que outros níveis mais elevados de alterações biológicas, como células, organismos e populações (STEGEMAN et al., 1992). Assim, um efeito tóxico pode ser manifestado ao nível subcelular antes que efeitos se tornem aparentes em níveis superiores. Alterações relacionadas ao estresse em funções bioquímicas e fisiológicas usualmente precedem o início de efeitos mais sérios nos níveis populacionais e de comunidade (BUCHELI; FENT, 1995) e são tidas como bioindicadores precoces de contaminação ambiental (PAYNE et al., 1987).

O uso de biomarcadores bioquímicos também oferece vantagens como boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas (SCHLENK, 1999). Elevadas atividades podem indicar exposição dos organismos a compostos indutores e, conseqüentemente, nos permite avaliar o grau e o possível risco de contaminação ambiental (STEGEMAN; HAHN, 1994).

Vários parâmetros bioquímicos em peixes têm sido testados quanto à sua resposta frente a substâncias tóxicas e seu potencial uso como biomarcador de exposição ou efeito. Biomarcadores que têm sido mais extensivamente usados incluem enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e seus metabólitos (enzimas de biotransformação e enzimas antioxidantes). Em peixes, o fígado é o órgão mais comumente envolvido na detoxificação de compostos exógenos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A toxicidade de compostos exógenos pode ser afetada pelo metabolismo, de forma benéfica (detoxificação) ou maléfica (bioativação) para o organismo. Efeitos tóxicos podem se manifestar quando os compostos relacionados ou metabólitos do agente xenobiótico se ligam a macromoléculas celulares, que podem, em última análise, levar a ruptura de membrana, dano à célula ou efeitos genotóxicos, que subseqüentemente podem conduzir ao desenvolvimento e progressão de doenças, como, por exemplo, o câncer (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Dentre os principais grupos de biomarcadores bioquímicos, podemos incluir os biomarcadores de neurotoxicidade, de biotransformação e de estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.3.2.1 Biomarcador de Neurotoxicidade

1.3.2.1.1 Atividade da Acetilcolinesterase

Enzimas de grande interesse e aplicação como biomarcadores são as colinesterases. Conhecem-se dois tipos de colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), com afinidade pela butirilcolina e conhecida como esterase não-específica ou pseudocolinesterase. Em peixes encontram-se ambas no tecido muscular, enquanto que no cérebro encontra-se somente AChE (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A AChE é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, formando colina e ácido acético. A medida da atividade da colinesterase é bastante utilizada para diagnosticar exposição a tóxicos anticolinesterásicos em peixes, e pode ser considerada

um dos biomarcadores mais antigos (SILVA DE ASSIS, 1998; STURM; SILVA DE ASSIS; HANSEN, 1999). Compostos como os inseticidas organofosforados e carbamatos inibem a colinesterase de maneira irreversível e reversível, respectivamente. Outros compostos como metais tóxicos e organoclorados parecem também inibi-la, porém a concentração necessária para promover esse efeito é relativamente mais alta (STURM et al., 2000; GALGANI; BOCQUENÉ; CADIOU, 1992).

Tendo em vista que organofosforados e carbamatos possuem tempo de meia-vida curto, a análise da inibição da AchE é uma ferramenta útil para avaliar seu efeito na biota aquática, mesmo quando os compostos químicos não são mais detectáveis no ambiente (VALBONESI; SARTOR; FABBRI, 2003). Peixes expostos a organofosforados apresentam redução da atividade da acetilcolinesterase (AchE) proporcional à concentração e ao tempo de exposição, com inibição dependente da natureza do organofosforado e da espécie de peixe exposta (WEISS, 1958).

Dentre os biomarcadores bioquímicos, a medida da atividade da colinesterase em peixe é uma clássica ferramenta para monitorar a poluição em águas marítimas (BOCQUENÉ; GALGANI; TRUQUET, 1990) e continentais (STURM; SILVA DE ASSIS; HANSEN, 1999).

1.3.2.2 Biomarcadores de Biotransformação

Na maioria das espécies animais o fígado é o principal órgão onde ocorre a biotransformação de xenobióticos. A biotransformação consiste na conversão de compostos apolares em compostos polares e mais solúveis em água, mais facilmente excretados (MALMSTRÖM et al., 2004). Geralmente, os biomarcadores de efeito mais sensíveis são alterações nos níveis e atividades de enzimas de biotransformação (MARTINEZ, 2006).

A biotransformação dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula. A biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes que atuam em diversos tipos de substratos (NICARETA, 2004).

A biotransformação é um processo dividido em duas partes, as reações de fase I e II, que freqüentemente ocorrem seqüencialmente. As primeiras são reações catabólicas como oxidação, redução, hidrólise. Nesta fase pode ser inserido um grupo hidroxila que servirá como ponto de ataque para a reação de conjugação da fase II (AZEVEDO; CHASIN, 2004). Na fase II, o xenobiótico, que pode ou não ter passado pela fase I do metabolismo, é

conjugado, através de reações catalisadas por enzimas, a moléculas de alta polaridade mais facilmente excretáveis (SCHLENK, 1999). Em peixes, a atividade destas enzimas pode ser induzida ou inibida após a exposição a xenobióticos (BUCHELI; FENT, 1995).

A fase II consiste em reações anabólicas que envolvem a conjugação de alguns grupos de moléculas resultando em compostos inativos na maioria dos casos (BUCHELI; FENT, 1995). As reações de conjugação são catalisadas por uma variedade de transferases, como a glutathione *S*-transferase.

1.3.2.2.1 Etoxirosorufina-*O*-deetilase (EROD)

As enzimas do citocromo P450 (ou simplesmente CYP450) são proteínas pertencentes à fase I da biotransformação que oxidam, hidrolizam ou reduzem xenobióticos e substâncias endógenas, que passam de compostos lipofílicos a hidrofílicos. Estas reações são o primeiro passo para excreção e detoxificação, porém também podem liberar intermediários reativos e tóxicos. Estas enzimas localizam-se principalmente no retículo endoplasmático liso e mitocôndrias de células hepáticas, renais, cérebro e outros órgãos (BUCHELLI; FENT, 1995). OMURA e SATO (1964) denominaram o sistema de citocromo P450 pelo fato do complexo formado com o monóxido de carbono apresentar um pico de absorção característico no comprimento de onda de 450 nm (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Numerosos estudos têm demonstrado indução do citocromo P450 em peixes por muitos contaminantes. A indução do CYP450 em fígado de peixes é reconhecida como um excelente biomarcador de exposição a contaminantes orgânicos antropogênicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, congêneres planares de bifenilas policloradas, dioxinas e furanos (GOKSOYR; FÖRLIN, 1992). O aumento da atividade das enzimas do citocromo P450 pode ser um dos sinais biológicos mais precoces da presença de poluentes indutores destas enzimas no ambiente aquático (PAYNE, 1976). A indução desse sistema é considerada um indicador biológico geral, mas sua resposta não permite discriminação de classes específicas de poluentes (GORBI; REGOLI, 2004). Através da alteração da estrutura química de compostos orgânicos, o citocromo P450 pode gerar compostos não tóxicos, menos ou mais tóxicos do que a substância original (SCHLENK, 2008).

A exposição a determinados contaminantes leva a estimulação da transcrição do gene CYP1A, resultando no aumento do nível de mRNA e também no aumento da respectiva atividade catalítica (ARINÇ; SEN; BOZCAARMUTLU, 2000). Assim, pode-se determinar a atividade de CYP450 em nível de mRNA ou nível protéico (*Western blotting*, localização

imunohistoquímica) ou através da atividade catalítica da enzima relacionada, a 7-etoxiresorufina. O método mais usado para avaliar a indução do CYP1A em resposta à contaminação ambiental envolve a medida da atividade de enzima de CYP1A usando o ensaio de EROD, que é baseado na taxa da O-deetilação da etoxiresorufina.

A etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) tem como substrato a 7-etoxiresorufina, e através de uma O-desalquilação, ocorre a formação de resorufina, que pode ser medida por espectrofluorometria. O aumento da atividade da EROD em vertebrados é um indicador da indução do CYP1A auxiliando, portanto, no monitoramento ambiental. Uma das vantagens da utilização da atividade da EROD como biomarcador é a simplicidade da sua mensuração (BUCHELI; FENT, 1995), especialmente quando o ensaio é realizado em microplaca conforme modificação de SILVA DE ASSIS (1998).

Metais, como prata, cádmio e cobre, desreguladores de regulação iônica, causam danos histológicos e são classicamente compostos que alteram a atividade da EROD. Dioxinas, bifenilas policloradas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos induzem o citocromo P4501A (CYP1A) e peixes expostos a organoestânicos, benzeno, cádmio e acrilamida apresentaram forte e significativa redução da atividade de EROD (BUCHELI; FENT, 1995; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.3.2.2.2 Glutathione S-Transferase (GST)

As enzimas de fase II têm um importante papel na homeostase, detoxificação e eliminação de diversas substâncias exógenas e os níveis de cofatores de fase II podem ser afetados após exposição a poluentes ambientais. Além de seu papel no transporte intracelular e biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, glutathione S-transferases têm um papel importante na defesa do DNA e lipídios contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Ligando-se covalentemente a compostos eletrofílicos, essas transferases reduzem a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas, como o DNA (HUGGETT et al., 1992). Assim, a toxicidade de muitos compostos exógenos pode ser modulada pela indução da atividade da GST (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As glutathione S-transferases (GST) são uma superfamília de enzimas diméricas, essencial na proteção contra danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo (MARIONNET; DESCHAUX; REYNAUD, 2006). A GST representa uma importante ferramenta para a detoxificação de xenobióticos e

tem sido sugerida como um biomarcador de exposição ambiental a poluentes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com a glutathiona reduzida (GSH), as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários como na estabilização de flavonóides e atuando com peroxidases na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool no processo de estresse oxidativo (DIXON; LAPTHORN, 2002).

A família das enzimas GST caracteriza-se por ampla especificidade a substratos com pouca afinidade e é por esta baixa eficiência catalítica que as GST possuem papel importante como agente desintoxicante de amplo espectro de compostos endógenos e exógenos (TEW; RONAI, 1999). A estimulação da enzima GST envolve reações de conjugação na presença de glutathiona. O quociente entre a glutathiona reduzida e a oxidada (GSH/GSSG) na célula é um bom indicador dos níveis de estresse oxidativo. A GST catalisa a conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com diversos tipos de xenobióticos ou componentes celulares danificados por espécies reativas de oxigênio (STOREY, 1996).

Essa superfamília de enzimas ocorre em organismos procarióticos, plantas, moluscos, crustáceos, insetos, anfíbios, répteis, peixes e mamíferos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Em vertebrados, o fígado é a maior fonte de GST. Apesar de algumas isoformas microssomais de GST terem sido descritas, a atividade de GST é principalmente encontrada no citosol (CNUBBEN et al., 2001).

O aumento na atividade da GST hepática foi relatado em muitos estudos após exposição de peixes a fungicidas, formulação comercial de glifosato, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas e organoclorados (ALMLI, EGAAS; LODE, 2002; BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2005; LU; WANG; ZHU, 2008; CONTARDO-JARA; KLINGELMANN; WIEGAND, 2009; KLEINOW; MELANCON; LECH, 1987), mas a maioria dos estudos não mostrou nenhuma alteração significativa. Por outro lado, redução significativa da atividade da GST foi observada em peixes em ambientes poluídos (VAN DER OOST, BEYER; VERMEULEN, 2003) e peixes expostos a dibenzodioxinas policloradas, pesticidas ou hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) e pesticidas como deltametrina (PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007).

1.3.2.3 Biomarcador de Estresse Oxidativo

O destino da maioria do oxigênio molecular consumido pelos animais é a redução a água ligada à oxidação de alimentos e produção de energia. A redução parcial resulta na formação do que tem sido denominado de espécies reativas de oxigênio (EROs). As formas de EROs incluem radical ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH), radical peroxil (RO_2), radical alcóxil (RO) e radical hidroperoxil (HO_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$, espécie reativa de nitrogênio) (HWANG; KIM, 2007; NORDBERG; ARNÉR, 2001; LIVINGSTONE, 2001).

Para a formação de EROs contribuem diversas fontes e processos endógenos, como certas enzimas, auto-oxidação, transporte de elétrons da membrana nuclear (MYERS, 1997). Essas moléculas são continuamente produzidas em animais, e podem reagir com a maioria das biomoléculas e danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (HWANG; KIM, 2007; VALAVANIDIS et al., 2006). Entretanto, alguns papéis fisiológicos benéficos das EROs têm sido descritos em diferentes áreas, incluindo sinalização intracelular e regulação do estado redox (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Cerca de 1 a 3% do oxigênio consumido é convertido em EROs, porém, essa taxa de produção pode ser alterada pela presença de diversos xenobióticos. Esses compostos são detoxificados dos organismos por defesas antioxidantes, que podem ser hidrossolúveis (ácido ascórbico, a vitamina C, carotenos e glutathione reduzida, a GSH), lipossolúveis (retinol, a vitamina A, e α -tocoferol, a vitamina E) e enzimas antioxidantes específicas (como superóxido-dismutase, catalase e glutathione-peroxidase). Uma prevalência de processos pró-oxidativos leva a um aumento de danos oxidativos, situação esta denominada estresse oxidativo. Dentre esses danos estão a lipoperoxidação, oxidação de proteínas e o dano ao DNA (LIVINGSTONE, 2001). Diversas moléculas podem alterar o balanço pró-oxidantes/antioxidantes, tornando o organismo suscetível ao estresse oxidativo (MONTSERRAT et al., 2007).

Uma variedade de poluentes ambientais, dentre eles os pesticidas, podem provocar um aumento na produção de radicais livres em diversos organismos aquáticos, como os peixes, e se os sistemas de defesas antioxidantes forem ineficiente para combater as EROs ocorre uma situação de estresse oxidativo (AHMAD et al., 2000; ÜNER et al., 2005).

1.3.2.3.1 Lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação lipídica, lipoperoxidação ou oxidação de ácidos graxos poliinsaturados é um processo fisiológico regular, considerando sua importância na maturação celular (SCHEWE; RAPOPORT; KÜHN, 1986) e mobilização de lipídios (FEUSSNER et al., 1995). Determinadas classes de contaminantes, contudo, podem acarretar efeitos deletérios nesse processo (SEVANIAN; URSINI, 2000), levando a um comprometimento no funcionamento celular (BAKER; KRAMER, 1999), destituição da função das membranas celulares e de organelas essenciais, tais como o processo de transporte, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (MEAGHER; FITZGERALD, 2000), com conseqüentes modificações estruturais dos complexos lipoprotéicos das membranas celulares (MASON; WALTER; MASON, 1997).

A oxidação de lipídeos é uma importante conseqüência do estresse oxidativo. A lipoperoxidação como conseqüência negativa do estresse oxidativo tem sido extensamente investigada (STEGEMAN et al., 1992). Esse processo ocorre por uma reação em cadeia e demonstra a habilidade de um único radical propagar reações bioquímicas deletérias (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A lipoperoxidação é um dos danos mais importantes causados pelas espécies reativas de oxigênio, sendo as membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. A lipoperoxidação tem se mostrado um potencial biomarcador de contaminação ambiental (STEGEMAN et al., 1992; HAI; VARGA; MATKOVICS, 1995) e através dela podemos inferir os danos causados às células pelo estresse oxidativo (KAPPUS, 1987).

Em conseqüência da lipoperoxidação, pode haver perda de integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, alteração no fluxo de íons transmembrana, disfunção no transporte de Na^+/K^+ , influxo excessivo de cálcio e ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases (OLIVEIRA, 1999; MEAGHER; FITZGERALD, 2000; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). As membranas lipídicas peroxidadas tornam-se rígidas e perdem sua permeabilidade e integridade (SEVANIAN e MCLEOD, 1997; VALAVANIDIS et al., 2006).

A lipoperoxidação tem sido utilizada com sucesso como uma medida de estresse oxidativo induzido por xenobióticos, em espécies expostas *in vivo* a uma variedade de substâncias químicas como metais (ferro, cádmio, mercúrio e cobre) e pesticidas como paraquat, malation, deltametrina e glifosato (KELLY et al., 1998; SAYED et al., 2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VALAVANIDIS et al., 2006).

1.4 Compostos químicos avaliados quanto à toxicidade

Os poluentes mais comumente encontrados em corpos de água são metais, defensivos agrícolas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos derivados de petróleo ou de origem sintética, detergentes e outros componentes dos esgotos doméstico e industrial e compostos ácidos (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2007), sendo, portanto, estas as classes de compostos químicos mais amplamente utilizados em bioensaios.

Metais tóxicos e compostos organoclorados podem ser perigosos nos níveis registrados no ambiente, pois trata-se de poluentes conservativos (não são biodegradados, ou, quando degradados, demandam longos períodos de tempo), o que acarreta sua permanente adição ao meio aquático. Conseqüentemente, apresentam significativo potencial para bioacumulação na biota aquática, podendo, inclusive, biomagnificar-se ao longo de cadeias alimentares (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Neste trabalho, estudamos a toxicidade dos compostos fipronil (capítulo 2), nitrato de chumbo (capítulo 3) e naftaleno (capítulo 4). Por se tratar de compostos químicos de ampla utilização, mais informações sobre a ação desses compostos em espécies de peixes neotropicais são necessárias, uma vez que os corpos d'água estão sujeitos a receberem esses tipos de contaminantes, justificando assim, a realização desse trabalho.

1.4.1 Fipronil

O aumento da população mundial e a demanda crescente de alimentos têm motivado o uso de grandes quantidades de pesticidas nas plantações, para prevenir ou combater pragas, visando assegurar maior produtividade. Dessa forma, muitos produtos são utilizados para eliminar formas de vida vegetal ou animal indesejáveis nas culturas agrícolas e na pecuária (SANCHES et al., 2003).

Após a Segunda Guerra Mundial, o número de substâncias novas e o uso extensivo dessas na agricultura aumentaram enormemente. O BHC (hexaclorobenzeno) e o DDT (1,1-bis (4-clorofenil)-2,2,2 triclouroetano) surgiram como uns dos mais importantes produtos químicos, sendo aplicados em larga escala nas lavouras para combater insetos. Com o aumento do plantio de monoculturas e a destruição da diversidade ocorreu o aparecimento de várias pragas, as quais são combatidas pelo uso de pesticidas. A quantidade e a variedade de produtos aplicados na agricultura e na pecuária aumentaram verticalmente, tornando necessário o monitoramento de eventuais resíduos no ambiente e nos alimentos. Para tanto,

têm sido desenvolvidos métodos analíticos com o intuito de avaliar os riscos de contaminação. O uso de tais compostos tem causado contaminação de sistemas aquáticos, sendo importante monitorar as águas subterrâneas, especialmente em áreas próximas a regiões agrícolas e locais que constituem fontes primárias de água potável (SANCHES et al., 2003).

O crescimento da quantidade de agroquímicos colocados no mercado pode ser constatado através do *Hanna's Handbook of Agricultural Chemicals* que, na sua publicação de 1952, listava 500 produtos. Nesta ocasião havia 182 inseticidas, 96 fertilizantes e 53 herbicidas. Na publicação de 1999 o número de pesticida chega a 20.000 (FOE, 2000 *apud* MARTINS, 2000). O Brasil apresenta há alguns anos, um dos maiores mercados na área de proteção de plantas, sendo que em 2010, o volume de fitossanitários consumidos colocou o país no 1º lugar mundial, movimentando cifras em torno de 5,4 bilhões de dólares (ANVISA, 2010).

O fipronil (Figura 04) é uma droga derivada do fenilpirazol que atua como inibidora não competitiva do GABA, sendo largamente utilizada como ectoparasiticida na medicina veterinária e como defensivo agrícola, porém a literatura referente aos possíveis efeitos adversos desta substância ainda é extremamente limitada (OHI et al., 2004). Várias substâncias químicas utilizadas na agricultura e veterinária têm sido descritas como suspeitas de interferirem em processos reprodutivos de animais, assim como de interferirem em processos biológicos do meio ambiente.

O fipronil é o ingrediente ativo dos inseticidas Frontline[®], Termidor[®], e Top Spot[®]. A sua fórmula química é C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS [5-amino-1[2,6-dicloro-4-(trifluormetil) fenil]-4-(trifluormetil) sulfinil]-1 H-pirazole-3-carbonitrilo) e peso molecular 437,1 g/mol. Apresenta-se na forma de pó branco cristalino, com densidade 1,477-1,626 g/ml a 20°C (OHI, 2002). Possui longa persistência no ambiente, podendo permanecer por até 123 dias com grande probabilidade de ser transferido para os depósitos naturais de água (BARRIGOSI; LANNA; FERREIRA, 2005).

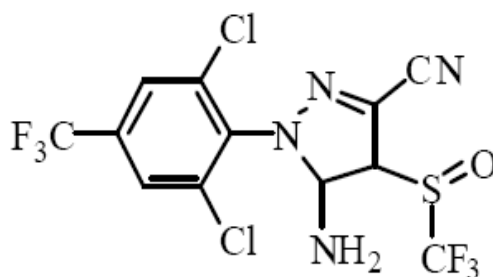


Figura 04 - Estrutura química do fipronil (Fonte: SCHLENK et al., 2001)

O fipronil é um membro da classe fenilpirazólico, que são principalmente químicos com um efeito inseticida. Ele é solúvel em água, estável em temperatura ambiente por um ano, mas não estável na presença de íons metálicos. Em 1997, sua produção foi cerca de 480 toneladas por ano (PAN-UK, 2007).

Baixas concentrações de fipronil são letais para a maioria das espécies de peixes que foram testadas, sendo particularmente tóxico a peixes juvenis. Em um estudo patrocinado por um fabricante do fipronil, uma concentração de 15 porções por bilhão (ppb) reduziu o crescimento de trutas. Além disso, o fipronil também é bioacumulado nos peixes, o que significa que a concentração do fipronil nos peixes de águas contaminadas é mais elevada do que a concentração do fipronil na água em que vivem (COX, 2007). Alguns experimentos têm mostrado que o composto apresenta efeitos prejudiciais em humanos (OLIVEIRA; BECHARA; CAMARGO-MATHIAS, 2008).

A toxicidade do fipronil em peixes varia de acordo com a espécie com valores de CL50 variando de 83 µg/l (*Lepomis macrochirus*) a 246 µg/l (*Oncorhynchus mykiss*) (PAN-UK, 2007). Ele é altamente tóxico ao *Lepomis macrochirus* (CL50 (Concentração Letal) 96h = 85 µg/l) e à *Oreochromis niloticus* (CL50_{96h}) = 42 µg/l), e menos tóxico ao *Oncorhynchus mykiss* (CL50_{96h} = 248 µg/l) e ao *Cyprinus carpio* (CL50_{96h} = 430 µg/l). Afeta o crescimento larval em *Oncorhynchus mykiss* em concentrações superiores a 6.6 µg/l (PAN-UK, 2007).

O fipronil é usado para uma grande variedade de pragas, incluindo controle de ectoparasitas em cães e gatos. É amplamente utilizado, aplicado na forma de grânulos ou iscas para controle comercial ou residencial de pragas em gramíneas e como um tratamento para sementes ou spray aéreo para controle de pragas na agricultura (WALSE et al., 2004).

O mecanismo de ação do fipronil é similar aos ciclodienos e envolve ligação não competitiva ao receptor ácido aminobutírico (GABA) bloqueando efetivamente os canais de cloro e resultando em paralisia (GRANT et al., 1998).

O fipronil prefere matrizes lipofílicas (orgânicas) tal com lipídeos, óleos, proteínas e solventes orgânicos, e é estável a temperatura ambiente (GUNASEKARA et al., 2007). O fipronil é um organoclorado dito menos persistente, com utilização liberada e introduzido no mercado no início da década de noventa, sendo utilizado como defensivo agrícola. Em um dos poucos trabalhos, OHI (2002) verificou que o fipronil pode ocasionar irregularidades no tempo de duração da fase estral e falha na fertilização em roedores.

A propriedade toxicológica do fipronil depende da formação de compostos derivados, como por exemplo, o metabólito sulfona e o fotoproducto desulfinil. Cada composto derivado do fipronil é, em geral, um componente bioativo. A toxicidade seletiva do fipronil para os

invertebrados em relação aos mamíferos está relacionada com a maior afinidade da substância ao receptor GABA, mas é também dependente da velocidade relativa de conversão em subprodutos persistentes e baixa seletividade destes metabólitos (HAINZL; COLE; CASIDA, 1998). Estudos têm demonstrado que os metabólitos sulfonados do fipronil podem ser considerados um evento de bioativação e mais tóxicos para peixes e pássaros (BEELER; SCHLENK; RIMOLDI, 2001).

Trata-se de um composto usado para controlar pragas no campo, em amplo espectro, porém, pode vir a afetar também insetos não alvo, sendo considerado um dos mais importantes inimigos de abelhas melíferas (FAOUDER et al. 2007), importantes na polinização. Por esta razão a França proibiu a comercialização do fipronil desde 1999. Itália, Alemanha e Eslovênia também já proibiram a sua aplicação. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América diz que o fipronil é altamente tóxico a peixes, invertebrados aquáticos e pássaros, mas relativamente menos tóxico para mamíferos, galinhas d'água e algumas espécies de pássaros (EPA, 1996).

1.4.2 Nitrato de chumbo

Inadequadamente chamados de “metais pesados” ou “metais-traço”, esses elementos constituem parte integrante do ambiente e da matéria viva, ocorrendo naturalmente em pequenas concentrações. Alguns são essenciais aos organismos vivos, ainda que em baixíssimas quantidades (como zinco, ferro, manganês, ferro e cobre), entretanto outros, como mercúrio, chumbo e cádmio, não têm função biológica conhecida e seus efeitos sobre os elementos da biota normalmente são deletérios. Mesmo os que possuem função biológica, quando em concentrações mais elevadas, podem causar toxicidade aos organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Dentre os poluentes, os metais potencialmente tóxicos representam um grupo especial, pois não são degradados, de forma natural, química ou biologicamente. A presença de metais potencialmente tóxicos no ambiente aquático e em concentrações elevadas pode causar a morte de animais e organismos fotossintetizantes. Altas concentrações de metais afetam organismos bentônicos, que são capazes de bioconcentrar esses contaminantes, causando efeito direto na cadeia alimentar aquática (ALEGRE, 2009).

O chumbo é um metal de cor branca acinzentada, brilhante, dúctil, macio e muito resistente à corrosão. Trata-se de um elemento não essencial que ocorre naturalmente no ambiente. Entretanto, as concentrações mais elevadas encontradas na natureza são resultado

de atividades humanas. Muitas das suas propriedades físicas e químicas como maleabilidade, ductilidade, pobre condutibilidade e resistência à corrosão, têm favorecido o uso do chumbo para uma grande variedade de aplicações pelo homem desde tempos antigos (GARCÍA-LESTÓN et al., 2010).

A entrada de chumbo em corpos de água ocorre principalmente por descargas industriais diretas e deposição de partículas aéreas, sendo observadas as maiores concentrações do metal em águas continentais, especialmente próximos aos grandes centros urbanos (PAIN, 1995). O chumbo é altamente tóxico e seus efeitos biológicos conhecidos são sempre deletérios. A forma química e sua concentração na água e nos sedimentos são os fatores que influenciam a taxa de absorção desse metal (PATTEE; PAIN, 2002).

Quanto à forma química do chumbo, as formas inorgânica e orgânica são utilizadas em diversos processos industriais (JOHNSON, 1998). A forma inorgânica é menos tóxica, já que a membrana plasmática é permeável ao organometal, porém a quantidade de chumbo inorgânico que circula nos ecossistemas é maior que a quantidade de chumbo orgânico (PAIN, 1995), sendo, portanto, a forma inorgânica a que mais causa problemas ambientais.

É bem documentado que o chumbo pode causar efeitos adversos à saúde que incluem neurotoxicidade, nefrotoxicidade e efeitos deletérios nos sistemas hematológicos e cardiovasculares (ATSDR, 2007). Também existem resultados que mostram que o chumbo induz resposta positiva em testes biológicos e bioquímicos, como inibição de enzimas, mutação, aberrações cromossômicas, câncer e defeitos congênitos (JOHNSON, 1998). Apesar disso, dados relacionados às propriedades mutagênicas, clastogênicas e carcinogênicas de compostos de chumbo inorgânico ainda são conflitantes.

A agência internacional para a pesquisa em câncer (IARC) classificou o chumbo como possível carcinógeno humano (grupo 2B) (IARC, 1987) e compostos de chumbo inorgânico como prováveis carcinógenos humanos (grupo 2A) (IARC, 2006). Em alguns estudos epidemiológicos a exposição ao chumbo foi associada a um aumento na incidência de alguns cânceres como de estômago, pulmão e bexiga (FU; BOFFETTA, 1995). Há diversos mecanismos propostos para melhor se compreender as propriedades carcinogênicas do chumbo e estes mecanismos incluem mitogênese, alterações na transcrição gênica, dano oxidativo e diversos mecanismos indiretos de genotoxicidade (HARTWIG, 1994; SILBERGELD, 2003).

A absorção de chumbo por organismos aquáticos pode ocorrer através da pele, brânquias, além da via alimentar (TAO et al., 1999). PAIN (1995) observou inibição da atividade de enzimas hematopoiéticas no peixe *Pleuronectes platessa* em baixas

concentrações de chumbo na água (10 µg/l). Em elevadas concentrações observou-se relatos de quadros anêmicos, redução na eclosão de ovos e curvatura lateral da espinha; em doses letais o chumbo induz aumento na produção de muco, o que resulta na obstrução das brânquias, podendo levar o animal à morte (PAIN, 1995).

1.4.3 Naftaleno

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais, tendo em vista que algumas dessas substâncias apresentam elevado potencial de toxicidade e são precursoras de efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007).

Os HPAs são compostos aromáticos formados por dois ou mais anéis aromáticos, constituídos exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio, organizados sob forma linear, angular ou agrupada (NETTO et al. 2000) produzidos naturalmente ou por processos industriais (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007). Fontes naturais de HPAs incluem incêndios florestais, escoamento de petróleo, vulcões e produção por organismos vivos, entretanto, as fontes antropogênicas dominam a entrada de HPAs na natureza. As maiores emissões de HPAs são oriundas de processos industriais ligados à produção de aço e alumínio, derramamentos do petróleo, descargas dos navios, da exaustão de incineradores de rejeito e por efluentes industriais e principalmente pela queima de combustíveis fósseis (WRIGHT; WELBOURN, 2002). Assim, maiores concentrações de HPAs são observadas próximo aos grandes centros urbanos.

Os HPAs têm uma variedade de efeitos nocivos em organismos aquáticos, incluindo efeitos carcinogênicos (particularmente para quatro, cinco e seis anéis aromáticos) e alterações dos sistemas endócrinos, entre outros (GESTO et al., 2009). HPAs acumulam-se rapidamente em organismos aquáticos e alcançam níveis maiores que os detectados no ambiente. São relatados como carcinogênicos e mutagênicos (HARVEY, 1991), responsáveis por prejudicar processos de crescimento, reprodução e osmorregulação em peixes (NICOLAS, 1999). Interferem na função da glândula endócrina, mimetizando ou bloqueando efeitos dos hormônios naturais (JOHNSON et al., 1998) e afetam processos de alocação de energia (ELUMALAI; BALASUBRAMANIAN, 1999).

Nos EUA, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) estabeleceu a inclusão de 16 HPAs, inclusive do naftaleno, na lista de contaminantes orgânicos prioritários, devido à alta

toxicidade, ao potencial carcinogênico e mutagênico de vários desses compostos e ao fato de serem resistentes à biodegradação (VALENTIM, 2006).

Entre os HPAs que apresentam elevada toxicidade aguda estão o naftaleno, antraceno, fluoreno, acenafteno, fenantreno, fluoranteno, pireno e criseno (CESTESB, 2008). O naftaleno é um dos HPAs mais intensivamente estudado devido à sua alta toxicidade, baixa sensibilidade à foto-oxidação, elevada persistência na água e baixo peso molecular (VIJAYAVEL et al., 2004). Em particular, o naftaleno e seus derivados, tais como alquilnaftaleno, são os mais abundantes HPAs presentes em óleos crus (AAS et al., 2000) e são freqüentemente encontrados em ambientes poluídos (LEE; ANDERSON, 2005).

Acredita-se que os naftalenos e fenantrenos (HPAs com respectivamente 2 e 3 anéis aromáticos) sejam os principais responsáveis pela toxicidade aguda do óleo cru (ANDERSON et al., 1974 *apud* POLLINO; HOLDWAY, 2002). Óleos crus contêm aproximadamente 1,5% de HPAs, dos quais o naftaleno é o principal componente perfazendo 65% da constituição de HPAs totais (TRUSCOTT; IDLER; FLETCHERET, 1992).

O naftaleno (Figura 05) tem fórmula química $C_{10}H_{18}$, peso molecular 128, 18 g/mol e apresenta-se como um sólido branco cristalino/flocos, odor forte de alcatrão, densidade de 1.14 g/cm^3 e solubilidade em água, a 20°C , de 0,3 g/100 ml (CETESB, 2010). Naftaleno é um poluente ubíquo introduzido no ambiente aquático principalmente através de processos de produção e destilação de produtos do carvão (ATSDR, 1995) bem como subprodutos de petróleo e por derramamentos (IRWIN et al., 1997; PACHECO; SANTOS, 2001).

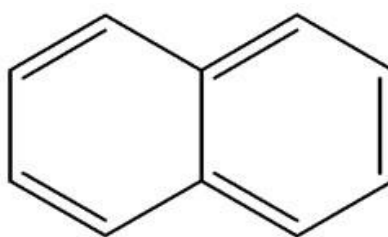


Figura 05 - Estrutura química do naftaleno (Fonte: CETESB, 2010)

Em geral, as populações dos peixes podem ser expostos no ecossistema aquático a uma concentração total de HPAs variando de 50 a 410 mg/l (KAYAL; CONNEL, 1989; SMITH; BAGG; WRIGLEY, 1991). Peixes podem absorver contaminantes orgânicos lipofílicos, tais como o naftaleno, do ambiente.

A exposição ao naftaleno induziu uma variedade de respostas tanto em nível celular como sistêmico em peixes teleósteos (NAVAS; SEGNER, 2000; TELES; PACHECO; SANTOS, 2003; THOMAS; BUDIANTARA, 1995). Na truta arco-íris, verificou-se que exposição ao naftaleno provocou diminuição nos níveis de hormônios esteróides do plasma e também afetou o metabolismo de energia em diversos órgãos que incluem o cérebro de maneiras dose e tempo dependentes (TINTOS et al., 2007).

O impacto do naftaleno em humanos e outros mamíferos tem sido estudado extensivamente (ORZALESI; MIGLIAVACCA; MIGLIOR, 1994). Entretanto, um número limitado de estudos tem sido conduzido para avaliar toxicidade do naftaleno em espécies aquáticas, notadamente peixes. A literatura recente da toxicidade do naftaleno em teleósteos abrange estudos de histopatologia (DI MICHELE; TAYLOR, 1978), fisiologia (KRAHM et al., 1984) e relações estrutura-toxicidade (BLACK et al., 1983). Mais recentemente, citotoxicidade (SCHIRMER et al., 1998), tempo de vida (GERT-JAN DE MAAGD et al., 1997) e respostas antioxidantes foram avaliadas. A genotoxicidade do naftaleno foi demonstrada em *Dicentrarchus labrax* (GRAVATO; SANTOS, 2002). Não obstante, considerando estudos em outras espécies que não peixes, o potencial genotóxico do naftaleno parece ser de difícil consenso (PACHECO; SANTOS, 2002).

Dentre os compostos aromáticos mais simples do petróleo se encontram o benzeno, o tolueno e o naftaleno. No mar, os peixes adultos apresentam uma resistência maior à poluição por petróleo do que seus ovos, larvas ou formas juvenis. Os adultos apresentam uma relativa resistência a este tipo de poluição, pois seu corpo, guelras e cavidade bucal são revestidos por um muco resistente à impregnação do petróleo. No entanto, compostos aromáticos individuais como o benzeno, o tolueno e o naftaleno podem ser muito agressivos (LAWS, 1993).

Objetivos

No desenvolvimento desta tese, nos capítulos seguintes, foram buscados atingir os seguintes objetivos:

- Estabelecer protocolo de preservação de amostras de sangue de peixe de água doce para a realização do ensaio, através da técnica de citometria de fluxo para verificação da viabilidade celular e do ensaio cometa para verificação de integridade de material genético.

- Avaliar a toxicidade do fipronil através de contaminação subcrônica (60 dias), semi-estática, por imersão, nas espécies de peixe nativas *Rhamdia quelen* (jundiás, espécie de fundo) e *Astyanax sp* (lambaris, espécie de coluna d'água) e na espécie de peixe exótica *Danio rerio* (paulistinha ou peixe zebra), nas concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l utilizando biomarcadores genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares e ensaio cometa em sangue) e bioquímicos (atividades da acetilcolinesterase cerebral, muscular e glutathione *S*-transferase e peroxidação lipídica).

- Avaliar a toxicidade do chumbo inorgânico através de contaminação subcrônica (30 dias), semi-estática, por imersão, nas espécies de peixe nativas *Rhamdia quelen* (jundiás) e *Astyanax sp* (lambaris), nas concentrações 0,01; 0,03 e 0,1 mg/l utilizando biomarcadores genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares e ensaio cometa em sangue) e bioquímicos (atividades da acetilcolinesterase cerebral, muscular, glutathione *S*-transferase e etoxiresorufina-*O*-deetilase e peroxidação lipídica).

- Avaliar a toxicidade do naftaleno através de contaminação subcrônica (28 dias), semi-estática, por imersão, nas espécies de peixe nativas *Rhamdia quelen* (jundiás) e *Astyanax sp* (lambaris), nas concentrações 0,005; 0,06 e 3 mg/l utilizando biomarcadores genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares e ensaio cometa em sangue) e bioquímicos (atividades da acetilcolinesterase cerebral, muscular, glutathione *S*-transferase e etoxiresorufina-*O*-deetilase e peroxidação lipídica).

CAPÍTULO I

Estabelecimento de condições experimentais para preservar amostras de sangue de peixe para análise com ensaio cometa e citometria de fluxo

Wanessa A. Ramsdorf; Fernando Guimarães; Marcos Ferraro; Juarez Gabardo; Edvaldo Trindade e Marta Margarete Cestari.

Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 673:78-81, 2009.

Abstract

When environmental analysis is performed, the high number of samples required and handling conditions during the transport of these samples to the laboratory are common problems. The comet assay is a useful, highly sensitive tool in biomonitoring. Some studies in the literature aim to preserve slides in lysis solution for use in the comet assay. Until now, however, no efficient methodology for preserving blood samples for this assay has been described. Because of this, the present report aimed to establish the proper conditions for samples maintenance prior to comet assay analysis. Samples were conserved in three different solutions: a high protein concentration solution (fetal bovine serum—FBS), an anticoagulant agent (a calcium chelator – ethylenediaminetetracetic acid – EDTA), and a salt buffered solution (phosphate buffered saline—PBS). Therefore, peripheral blood samples of *Rhamdia quelen* specimens were collected and maintained in these solutions until testing at 72 h. Analyses of DNA fragmentation via the comet assay and cell viability via flow cytometry were performed at intervals of 24 h. The results showed that samples maintained in FBS were preserved better; this was followed by those preserved in PBS and then last by those preserved in EDTA. In conclusion, blood samples from freshwater fish can be preserved up to 48 h in fetal bovine serum at 4°C in the absence of light. In this period, no DNA fragmentation occurs. We thus describe an excellent method of sample conservation for subsequent analysis in the laboratory.

1. Introdução

O comitê consultivo do ambiente marinho (ACME) do Conselho Internacional para Exploração Marinha (ICES) recomenda uma amostragem de 25 peixes/locais de amostragem para estudos de pesquisa. Esta situação pode conduzir a uma carga de trabalho caótica, especialmente porque subamostras são necessárias para cada indivíduo [1]. Então, a fixação de amostras biológicas representa uma etapa fundamental. Infelizmente, tais procedimentos conduzem freqüentemente a vários graus de artefatos [2]. Para avaliar a preservação da amostra diversos ensaios são necessários. O ensaio cometa é um método rápido e relativamente barato para medir danos ao DNA. Este ensaio tem encontrado até aqui muitas aplicações, particularmente em biomonitoramento e monitoramento ambiental [3]. A citometria de fluxo é outra importante análise usada para estudar a integridade celular [4]. Sua

capacidade em avaliar um elevado número de células com rapidez faz da citometria de fluxo uma ferramenta útil para a avaliação de micronúcleos (MN) [5].

Os pioneiros em automatizar o ensaio do MN em roedores usando citometria de fluxo descreveram uma correlação entre contagem manual em microscópico e no citômetro de fluxo de células micronucleadas [6]. Tendo em vista que existem métodos diferentes para manter a estabilidade biológica da amostra durante o transporte ou procedimentos laboratoriais a preservação das células é importante, pois permite que nós executemos ensaios cometa e análise de citometria de fluxo em estudos de toxicologia ambiental, assim, o objetivo deste estudo foi identificar a melhor solução para manter a integridade de eritrócitos dos peixes. Assim, nós usamos tampão fosfato salino (PBS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e soro bovino fetal (FBS). PBS é uma solução salina comumente usada na bioquímica, com muitos outros usos já que é isotônico e não tóxico às células [7]. EDTA é usado para amostras de sangue devido à sua função como anticoagulante [8] e FBS é amplamente utilizado na cultura de células e apresenta elevada concentração de proteínas.

2. Material e métodos

2.1 Amostras

Seis espécimes de jundiá (*Rhamdia quelen*) foram adquiridos comercialmente e a aclimação foi realizada por quatro semanas em tanques aerados em temperatura constante (22°C) sob luz controlada (12/12 claro/escuro). Cada espécime foi anestesiado com benzocaína 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha) [9], e o sangue periférico obtido da veia dorsal por punção vertical da nadadeira anal sob o canal hemal. Um total de 10µl da amostra de sangue foi armazenado em 1 ml de tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4) e outro 1ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 0,5 M) ou 1ml de soro bovino fetal (FBS). Todas as amostras foram mantidos a 4°C e protegidas da luz. Após um intervalo de 24 h (tempo 0, 24, 48, e 72 h), ensaio cometa e citometria de fluxo para avaliação da viabilidade foram realizados.

2.2 Ensaio cometa alcalino

O ensaio cometa foi realizado com sangue periférico (eritrócitos) como descrito previamente [10]. Brevemente, 10 µl do sangue homogeneizado derivado de cada solução teste foram diluídos em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMA) e colocado em uma lâmina coberta por agarose normal. As lâminas foram colocadas na solução de lise (solução de lise estoque: NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8 %), N-lauril-sarcosinato (1%); solução de lise uso: triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque), por 24 h a 4 °C. Na etapa seguinte, as lâminas foram primeiramente imersas em uma solução de NaOH (10 N) e de EDTA (200 mM), pH 13 por 20 minutos, para efetuar a desnaturação do DNA, e submetido então à eletroforese a 300mA, 25V por 25 min. Após a neutralização em 0,4 M Tris, pH 7,5 e fixação no álcool etílico por 10 min, cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e analisados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Cem cometas em cada lâmina foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes, predefinidas no que diz respeito à intensidade da cauda, e a cada cometa foi dado um valor de 0, de 1, de 2, de 3, ou de 4 (de não danificado (0) ao dano máximo (4)) [11]. A diluição da amostra foi necessária em detrimento do grande número de células por microlitro em sangue de peixes (neste trabalho nós encontramos 2×10^7 células/µl).

2.3 Citometria de fluxo

Aquisição de dados e análise foi realizada com foco nas características morfológicas, presença de restos celulares e integridade de membrana em um citômetro FACScalibur equipado com um laser íon argônio a 488nm. Para as medidas, um total de 20.000 células foram coletadas de cada tubo de amostra usando programas CellQuest e WinMDI 2.9. Para avaliar a integridade de membrana usando iodeto de propídio (PI), 50 µl de amostras de sangue foram transferidos cuidadosamente para um tubo de teste. PI foi adicionado à concentração final concentração de 50 µg/ml. Amostras foram gentilmente ressuspensas e incubadas por 10 min à temperatura ambiente no escuro. Iodeto de propídio foi usado pois é bem conhecido que cora núcleo de células sem membrana íntegra. Já que PI é um corante supravital, ele pode distinguir entre células necróticas (coradas fluorescente) e viáveis (negativas) [4]. Essa análise foi realizada com corante PI para excluir restos celulares da análise da viabilidade.

2.4. Análise estatística

O teste de Kruskal-Wallis foi usado no ensaio cometa para comparar as diferenças entre as soluções teste (PBS, EDTA, e FBS) e diferentes tempos (0, 24, 48 e 72 h). Para citometria de fluxo, os dados obtidos foram transformados por $\sqrt{x + 0.5}$ para assegurar uma distribuição normal. Estes dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com um diagrama fatorial para determinar a significância estatística. O teste de Tukey foi executado quando os efeitos da interação eram significativos. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados e Discussão

Algumas pesquisas sugerem a possibilidade de armazenar lâminas na solução de lise por períodos de até quatro meses [12]. Entretanto, pesquisas desenvolvidos por Belpaeme et al. (1998) mostraram um possível efeito de armazenar as lâminas na solução de lise, que produziam mudanças nos padrões do cometa em amostras armazenadas por um período prolongado [1]. Para análise da melhor solução para conservação da amostra, o ensaio cometa foi realizado para avaliar possível dano ao DNA em células de sangue até 72 h após a coleta e comparar as amostras em diferentes soluções teste.

Prévias observações mostram que amostras de sangue de peixe coletadas com heparina e transportadas para o laboratório em gelo, coagulavam. A análise estatística do ensaio cometa detectou diferença significativa entre dano ao DNA induzido pela conservação em FBS e PBS, bem como diferenças na preservação do DNA foi notada entre FBS e EDTA (0 h: $p = 0,0201$; 24 h: $p = 0,0285$; 48 h: $p = 0,0484$; 72 h: $p = 0,015$ para FBS e PBS e 0 h: $p = 0,0399$; 24 h: $p = 0,0119$; 48 h: $p = 0,0248$; 72 h: $p = 0,0035$ para FBS e EDTA). Entretanto, diferença entre PBS e EDTA não foi observada (0 h: $p = 0,7869$; 24 h: $p = 0,7456$; 48 h: $p = 0,7869$; 72 h: $p = 0,6265$). Em todos os tempos testados, células preservadas em FBS sempre apresentaram menor dano genético em comparação com as outras soluções (Fig. 1).

O ensaio cometa igualmente permitiu que nós verificássemos quais períodos e soluções forneceram melhor estocagem do sangue para nossas suspensões celulares. As amostras de sangue acondicionadas em FBS ($p = 0,1509$) ou em PBS ($p = 0,1597$) não exibiram diferenças nos danos entre os tempos testados. Enquanto que as amostras acondicionadas em EDTA não apresentaram diferenças de dano entre tempo 0 e 24 h ($p = 0,0724$), 24 h e 48 h ($p = 0,4379$), 24 h e 72 h ($p = 0,4877$), e 48 h e 72 h ($p = 0,9349$), e

mostraram diferenças significativas entre 0 e 48 h ($p = 0,0101$), 0 e 72 h ($p = 0,0128$), com tempos finais de 48 e 72 h ocasionando danos mais elevados ao DNA (Fig. 1).

Análises de citometria de fluxo executadas nos tempos (0, 24, 48, e 72 h) foram realizadas a fim identificar tanto mudanças nas características morfológicas (P1) quanto viabilidade celular (P2). As análises de P1 foram executadas com o objetivo de detectar as células apoptóticas [4]. ANOVA mostrou claramente diferenças entre as soluções do armazenamento ($p < 0,01$). O teste de Tukey revelou diferenças entre PBS e EDTA assim como FBS e EDTA. O FBS apresentou as médias mais elevadas, indicando menores mudanças morfológicas nas características das células. Isto foi seguido por PBS e então por EDTA (Tabela 1). A análise P1 ainda revelou um efeito do tempo de armazenamento, com 72h sendo diferente dos demais grupos. Interação entre tempo e solução não foi observada. Estas diferenças observadas somente em 72 h indicam níveis mais baixos de células morfolologicamente intactas.

A análise de P2 foi realizada usando iodeto de propídio para verificar a viabilidade celular. ANOVA mostrou uma diferença entre os tratamentos ($p < 0,01$), indicando efeito da solução assim como efeito do tempo. Entretanto, não observamos interação entre tempo e substância. Não foi observada diferença entre as soluções PBS e EDTA, mas foram observadas diferenças entre EDTA e FBS bem como entre PBS e FBS. EDTA foi a solução com maior número de células inviáveis. PBS teve poucas células inviáveis e FBS teve o menor número de células inviáveis (Tabela 1). O teste de Tukey mostrou diferença entre os tempos de 0 e 72 h; os períodos intermediários (24 – 48 h) foram similares aos tempos inicial e final. Fig. 2 mostra células inviáveis sob as barras.

Quando as diferentes soluções foram comparadas, nós observamos que FBS melhor preservou as amostras de sangue de peixe coletadas. Não foram significativas as diferenças entre preservação de amostras até 72 h depois da coleta; até esse período as células preservadas em FBS mostraram menor dano ao DNA que as células preservadas nas outras duas soluções. Nossos resultados sugerem que PBS e EDTA não foram suficientes para preservar o material genético nesse tempo.

Esses dados conjuntamente sugerem que FBS preservou melhor as células e seu material genético. A preservação em PBS foi estatisticamente similar àquela em FBS em P1 (análise da morfologia), sugerindo que PBS provocou pouca alteração morfológica. Entretanto, a análise P2 mostrou que as células estavam inviáveis. Estes dados confirmam os resultados obtidos pelo ensaio cometa, que mostrou significativamente mais quebras no DNA das células mantidas em PBS que em FBS. Estes resultados podem ser relacionados à baixa

osmolaridade do PBS (149,14 mM) em comparação com a geralmente encontrada nas células de peixes de água doce (292,5mM em *Salmo trutta* [13]). A diferença de osmolaridade entre o sangue e o PBS pode ter levado a um influxo da água nas células que não apresentaram alteração em sua morfologia ou formação dos restos celulares. O núcleo pode assim ter sido afetado (expelido), reduzindo a viabilidade celular.

EDTA foi usado para preservação da amostra de sangue devido à sua função como anticoagulante. Esse agente seqüestra íons cálcio, importantes cofatores de diversas proteases na cascata de coagulação sangüínea, sendo, dessa forma, um bom anticoagulante [8]. Entretanto, nossos dados mostraram que EDTA não é uma boa solução para preservar as amostras analisadas. No ensaio de citometria, nós observamos que EDTA provoca danos lentamente no material genético das células em suspensão (Tabela 1). Esses resultados concordam com estudos que verificaram perda progressiva e irreversível das respostas linfoproliferativas antígeno-específicas em células mononucleares de sangue periférico obtidas de sangue exposto ao EDTA [8]. Além disso, uma pesquisa realizada por Machella et al., 2006 mostrou que quando DNA de peixes teleósteos (*Dicentrarchus labrax*) foi extraído e mantido na presença de EDTA, esse composto igualmente não reduziu níveis basais de quebras ao DNA [14].

FBS foi a melhor solução testada. Esta característica pode ser devido à sua composição. O soro é uma rica fonte de proteínas, fatores de crescimento, aminoácidos, carboidratos, íons, vitaminas e outros compostos. Diversos componentes do soro foram provavelmente benéficos para proteger as amostras de sangue neste estudo. Além disso, a elevada quantidade de glicose presente no soro (~0,6-1,2 mg/ml) [15] poder servir como fonte de energia para o metabolismo celular [16]. A presença de inibidores de protease é particularmente importante devido à sua atividade de anti-tripsina, que inibe esta enzima de atuar nos glóbulos do sangue. Adicionalmente, a osmolaridade do soro (322 mM [15]) foi similar àquela do sangue de peixes de água doce (292.5 mM em *Salmo trutta* [13]). Conseqüentemente, esta solução é apropriada para este tipo de célula. Entretanto, avaliações adicionais podem revelar que esta solução pode não ser a melhor opção para organismos marinhos (osmolaridade do sangue em *Myxine* é 1118.32 mM, peixe-bruxa [13]).

Interessantemente, as amostras mantidas em FBS por 72 h mostraram menor dano ao DNA que em 48 h. Dados similares foram obtidos para PBS. Como o ensaio cometa é um método muito sensível, estes dados sugerem que o reparo do DNA pode ter ocorrido nas células durante o tempo avaliado [17].

Concluímos que soro bovino fetal melhor preservou as células do sangue e o material genético de peixes de água doce por tempos variando de 0 a 48 h. Recomendamos seu uso (a 4°C na ausência de luz) para manutenção de sangue de peixes coletados em campo quando o processamento imediato do material é impossível.

Referências Bibliográficas

- [1] K. Belpaeme, K. Cooreman, M. Kirsch-Volders, Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish, *Mutat. Res.* 415 (3) (1998) 167–184.
- [2] J. Dubochet, N. Sartori Blanc, The cell in absence of aggregation artifacts, *Micron* 32 (1) (2001) 91–99.
- [3] G. Frenzilli, M. Nigro, B.P. Lyons, The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments, *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* 681 (2009) 80-92.
- [4] B. Canonico, L. Zamai, S. Burattini, V. Granger, F. Mannello, P. Gobbi, C. Felici, E. Falcieri, J.T. Reilly, D. Barnett, S. Papa, Evaluation of leukocyte stabilisation in TransFix[®]-treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy, *J. Immunol. Methods* 295 (2004) 67–78.
- [5] P. Sánchez, M.T. Llorente, A. Castaño, Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, vincristine sulfate and benzo(a)pyrene, *Mutat. Res.* 465 (2000) 113–122.
- [6] K.J. Hutter, M. Stohr, Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry, *Histochemistry* 75 (3) (1982) 353–362.
- [7] J. Stenesh, *Biochemistry*, Plenum Press, New York, 1998.

- [8] P. Kumar, V. Satchidanandam, Ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether) tetraacetate as a blood anticoagulant: preservation of antigen-presenting cell function and antigen-specific proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from stored blood, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7 (4) (2000) 578–583.
- [9] L.C. Gomes, A.R. Chippari-Gomes, N.P. Lopes, R. Roubach, C.A.R.M. Araújo-Lima, Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*, *J. World Aquacult. Soc.* 32 (4) (2001) 426–431.
- [10] M.V. Ferraro, A.S. Fenocchio, M.S. Mantovani, M.M. Cestari, C.A.O. Ribeiro, Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay, piscine micronucleus and chromosome aberrations tests, *Genet. Mol. Biol.* 27 (2004) 103–107.
- [11] A. Collins, M. Dusinská, M. Franklin, M. Somorovská, H. Petrovská, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslová, N. Vaughan, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (2) (1997) 139–146.
- [12] D.E. Nacci, S. Cayula, E. Jackim, Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay, *Aquat. Toxicol.* 35 (1996) 197–210.
- [13] W.T.W. Potts, G. Parry, *Osmotic and Ionic Regulation in Animals*, Pergamon, Oxford, 1964.
- [14] N. Machella, M. Battino, B. Pisanelli, F. Regoli, Influence of the SCGE protocol on the amount of basal DNA damage detected in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, *Environ. Mol. Mutagen.* 47 (2006) 579–586.
- [15] H.R. Maurer, Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture, in: R.I. Freshney (Ed.), *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, Oxford, IRL Press, 1986, pp. 13–30.

[16] K.L. Scott, J. Lecak, J.P. Acker, Biopreservation of red blood cells: past, present, and future, *Transf. Med. Rev.* 19 (2) (2005) 127–142.

[17] E.E. Visvardis, A.M. Tassiou, S.M. Piperakis, Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H_2O_2 and λ -irradiation with the alkaline comet assay, *Mutat. Res.* 383 (1997) 71–80.

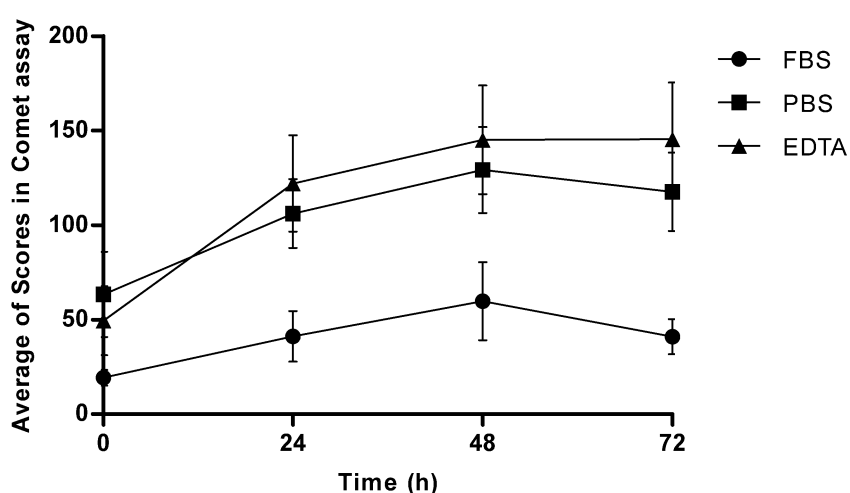


Fig. 01. Comparação das respostas do ensaio cometa (escores) de células de sangue para diferentes tempos de incubação (0, 24, 48 e 72 h) e soluções (FBS, PBS e EDTA).

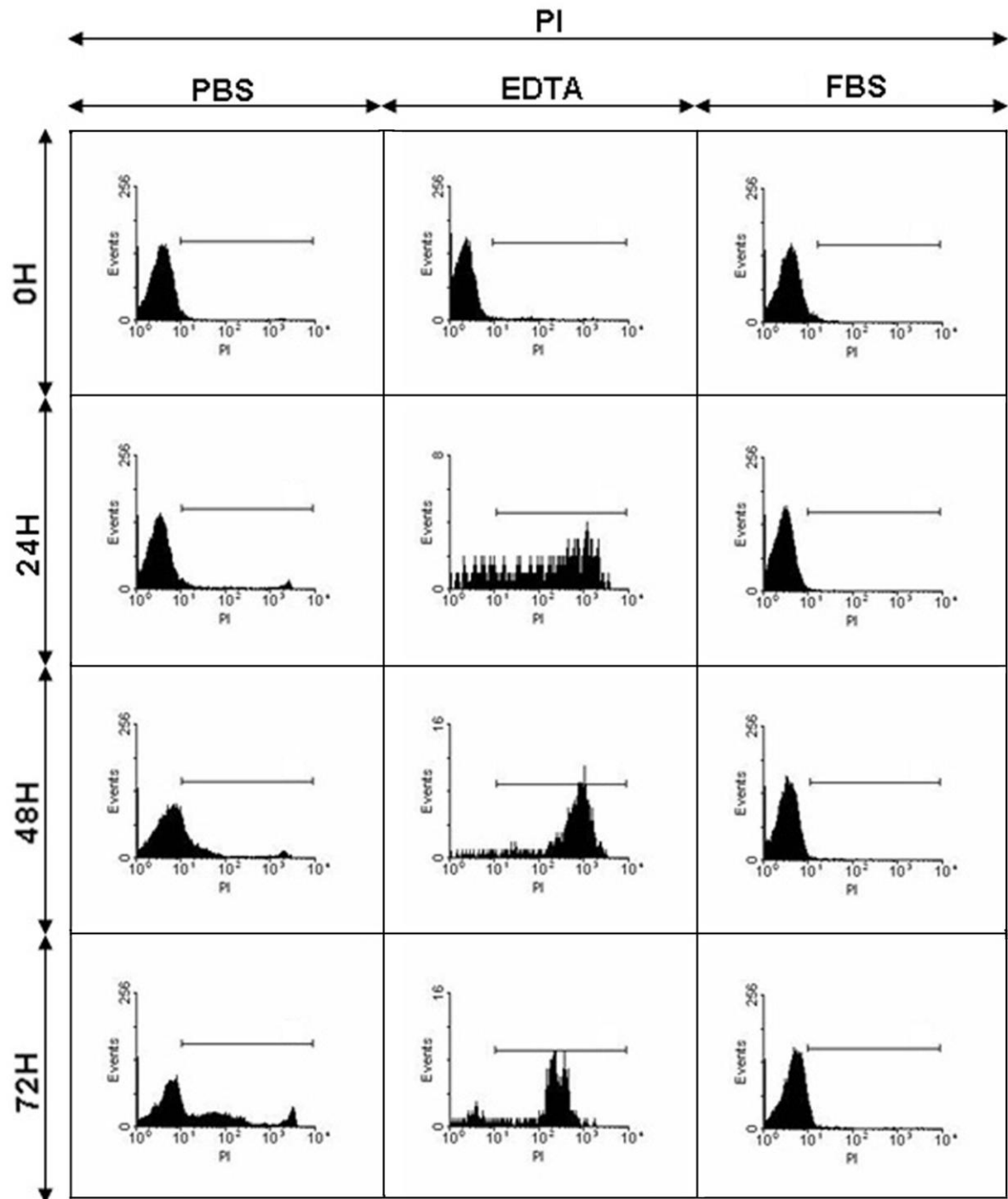


Fig. 02. Viabilidade de células com PI, iodeto de propídio. Histogramas indicam células inviáveis deslocadas sob as barras.

Tabela 01. Citometria de Fluxo: diferenças entre soluções e diferenças entre tempos

	Soluções			Tempos			
	PBS	EDTA	FBS	zero	24h	48h	72h
Média transformada de P1	122.43 ^a	46.51 ^b	127.14 ^a	105.23 ^A	102.16 ^A	99.78 ^A	87.61 ^B
Média transformada de P2	40.05 ^c	43.16 ^c	24.74 ^d	27.72 ^C	34.73 ^{CD}	39.14 ^{CD}	42.34 ^D

Dados de citometria foram transformados com $\sqrt{x+0.5}$, onde x é o valor absoluto do número de eventos em 20.000 células sem trocas nas características morfológicas (P1) e sem viabilidade (P2). Diferentes soluções (PBS, EDTA e FBS) foram analisadas em diferentes tempos (0 h, 24 h, 48 h e 72 horas) em todas as situações $p < 0,01$. Letras minúsculas indicam comparação entre soluções e letras maiúsculas indicam comparação entre tempos. A mesma letra indica a falta de diferença estatisticamente significativa, e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativa.

CAPÍTULO II

Avaliação da toxicidade subcrônica (60 dias) do Fipronil em *Rhamdia quelen*, *Astyanax sp* e *Danio rerio* através de biomarcadores genéticos e bioquímicos

Resumo

O fipronil é um inseticida registrado em 1996 e usado para uma variedade de pragas, inclusive como ectoparasiticida na medicina veterinária e como defensivo agrícola, porém, estudos sobre os possíveis efeitos adversos desta substância são extremamente limitados. Apesar de ter seu uso banido em alguns países como França, Itália e Alemanha no Brasil ainda tem seu uso liberado. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito tóxico do fipronil em contaminação subcrônica, por 60 dias, nas concentrações 0,05 µg/l; 0,10 µg/l e 0,23 µg/l em duas espécies de peixes nativas: *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* e na espécie de peixe *Danio rerio*, modelo em estudos ecotoxicológicos. Os biomarcadores utilizados foram teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa, atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral (AChE muscular e cerebral), atividade da Glutathione *S*-transferase (GST) e quantificação dos níveis de Lipoperoxidação (LPO). Em *R. quelen* as concentrações 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil aumentaram a frequência de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares, danos ao DNA observados pelo ensaio cometa; a concentração 0,23 µg/l induziu aumento na atividade da GST e nas três concentrações testadas (0,05 µg/l; 0,10 µg/l e 0,23 µg/l) houve aumento na atividade da AChE cerebral. Na atividade da AChE muscular e nos níveis de LPO não foi observada alteração em *R. quelen*. Em *Astyanax sp*, as três concentrações de fipronil testadas (0,05; 0,10 e 0,23 µg/l) promoveram quebras no DNA detectadas através do ensaio cometa e alteraram as atividades das enzimas AChE muscular (com depleção da atividade nos grupos expostos ao fipronil) e GST (com indução da atividade da enzima nos grupos expostos ao inseticida). No teste do micronúcleo písceo, atividade da AChE cerebral e nos níveis de LPO não foram observadas diferenças entre os grupos controle e contaminados. No bioensaio com a espécie *D. rerio*, somente a atividade da acetilcolinesterase mostrou-se sensível à contaminação pelo fipronil nas concentrações 0,10 e 0,23 µg/l, não tendo sido observada alteração nos níveis de quebras no DNA, nos níveis de LPO, nem alteração significativa na atividade da GST. Nossos resultados indicam elevado potencial tóxico do fipronil em espécies de peixe nativas (*R. quelen* e *Astyanax sp*), até mesmo em concentrações recomendadas como seguras por agências internacionais.

1. Introdução

O ambiente aquático é altamente afetado por descargas diretas e também por escoamentos de efluentes nos corpos de água. Dessa forma, esse ambiente está exposto a processos de poluição causados pela grande variedade e quantidade de substâncias químicas

(LIVINGSTONE, 1993).

O Brasil possui aproximadamente 18% do potencial hídrico superficial utilizável do planeta (SETTI, 1998), sendo também um país com grande destaque mundial no que se refere à agropecuária. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 2010, o Brasil foi o maior consumidor de defensivos agrícolas do mundo (ANVISA, 2010). Muitos pesticidas são potencialmente perigosos para a saúde humana como para outros organismos podendo causar danos ao ecossistema.

O fipronil [5-amino-1[2,6-dicloro-4-(trifluormetil) fenil]-4-(trifluormetil) sulfinil]-1 H-pirazole-3-carbonitrilo) é um membro da classe dos pesticidas fenilpirazólicos, que atua como inibidor não competitivo do receptor GABA, bloqueando efetivamente os canais de cloro e resultando em paralisia (WALSE et al., 2004). Um inseticida registrado nos Estados Unidos em 1996, usado para uma variedade de pragas, inclusive como ectoparasiticida na veterinária e como defensivo agrícola, especialmente para controle de formigas. Apesar de largamente utilizado, a literatura referente aos possíveis efeitos adversos desta substância ainda é extremamente limitada (OHI et al., 2004). Aproximadamente 54 toneladas de fipronil foram usadas na Califórnia em 2005, especialmente no controle de pragas (CDPR, 2005). Pode ser aplicado na forma de grânulos ou iscas para controle comercial ou residencial de pragas em gramíneas e como um tratamento para sementes ou spray aéreo para controle de pragas na agricultura (WALSE et al., 2004).

Baixas concentrações de fipronil são letais para a maioria de espécie de peixes que foram testados, sendo particularmente tóxico a peixes juvenis. Estudos indicam que a dose 15 µg/l reduziu o crescimento de trutas. Além disso, esse composto também é bioacumulado em peixes (COX, 2007). Sua toxicidade em peixes varia de acordo com a espécie, sendo altamente tóxico ao *Lepomis macrochirus* (CL50 96 h = 85 µg/l), à *Oncorhynchus mykiss* (CL50 96 h = 248 µg/l) e à *Cyprinus carpio* (CL50 96 h = 430 µg/l). Também é muito tóxico à *Oreochromis niloticus* (CL50 96 h = 42 µg/l) e *Poecilia reticulata* (CL 50 96h inferior a 100 µg/l, segundo MANRIQUE, 2009), afeta o crescimento larval na *Oncorhynchus mykiss* em concentrações superiores a 6.6 µg/l (PAN-UK, 2007). É classificado como possível carcinógeno humano, com base no aumento de células tumorais em tireóide de ratos (EPA, 1996). A literatura relata que alguns de seus metabólitos, como o disulfinil, são ainda mais tóxicos (SCHLENK et al., 2001). Teve seu uso banido em alguns países como França, Itália, Alemanha e Eslovênia.

Para se detectar e avaliar os efeitos biológicos dos poluentes presentes no ambiente são utilizados biomarcadores, tais como fluídos corpóreos, células ou tecidos que indiquem,

em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes. Também podem ser avaliadas respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos (LIVINGSTONE, 1993). O uso de biomarcadores como uma resposta biológica mensurável em organismos é importante para simplificar e reduzir os custos de monitoramento biológico, especialmente em ambientes aquáticos (COSTA et al., 2007).

Biomonitores são organismos (plantas, animais, fungos, bactérias, etc.) que mostram uma resposta integrada a fatores ambientais, que podem ser usados como um sistema complementar para monitorar os efeitos dos poluentes e fornecer indicadores reais da qualidade e da característica dos ambientes (BATZIAS; SIONTOROU, 2006). Peixes estão entre os organismos mais indicados para monitoramento da qualidade ambiental de ambientes aquáticos, pois ocupam diferentes níveis na cadeia trófica, sofrem bioacumulação, respondem aos agentes químicos em baixas concentrações e respondem como os mamíferos frente aos agentes tóxicos (GOKSOYR et al., 1991). Entretanto, poucos estudos de toxicidade usando espécies de peixes de água doce nativas da América do Sul estão disponíveis (COSTA et al., 2007).

Rhamdia quelen, ou jundiá, pertence à família Heptapteridae (NELSON, 2006), é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, encontrada do sul do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma espécie nativa promissora para o cultivo, com rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES et al., 2000). É uma espécie resistente ao inverno e apresenta rápido crescimento no verão (BARCELLOS et al., 2003).

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto por Baird & Girard (1854) e a revisão mais recente cita 86 espécies (LIMA et al., 2003). Pertencente à família Characidae (FINK; FINK, 1981), popularmente conhecidos por lambaris, são utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho mas grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975) e têm sido consideradas como zooplânctívoras, insetívoras e onívoras, com papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas (SANTOS, 1981).

Danio rerio, família Cyprinidae, popularmente conhecido como peixe zebra, é originário da Ásia e facilmente mantido em condições controladas de laboratório (WESTERFIELD, 2000). Transformou-se na última década em organismo modelo nos campos da biomedicina, ecotoxicologia e genética (BOPP; LETTIERI, 2007) com interesse crescente em pesquisas nos campos da toxicologia e da ecotoxicologia, como um organismo vertebrado não-mamífero na avaliação de risco e na regulamentação (SCHIRMER, 2006). O

seqüenciamento completo do seu genoma impulsionou para que a comunidade científica reconhecesse o peixe zebra como principal organismo vertebrado nos campos acima mencionados (BOPP; MINUZZO; LETTIERI, 2006). Experimentos com peixe-zebra são fáceis, rápidos e baratos, sendo bastante fácil sua aquisição em lojas comerciais.

Sendo o fipronil um defensivo agrícola de utilização liberada no Brasil e não existem limites de detecção desse composto estabelecidos na legislação brasileira, o objetivo desse trabalho foi verificar a toxicidade subcrônica (60 dias) do fipronil em contaminação semi-estática por imersão, em três diferentes concentrações: 0,05 µg/l (metade do limite aceito pela comunidade européia); 0,10 µg/l (limite permitido em águas pela comunidade européia, TINGLE et al., 2000) e 0,23 µg/l, concentração ambientalmente realística (MIZE; PORTER; DEMCHECK, 2008). Os biomarcadores empregados nas espécies de peixe *Rhamdia quelen* (espécie de fundo) e *Asyanax sp* (espécie de coluna d'água) - ambas nativas- e *Danio rerio* foram: genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares e danos ao DNA pelo ensaio cometa alcalino do sangue) e bioquímicos (de neurotoxicidade: acetilcolinesterase em cérebro e em músculo; de biotransformação: glutathione *S*-transferase; e de estresse oxidativo: peroxidação lipídica).

2. Material e Métodos

2.1 Exposição

Em experimentos separados, exemplares de jundiás juvenis (*Rhamdia quelen*; N=60) e de lambaris (*Astyanax sp*; N=60) foram adquiridos comercialmente e mantidos para aclimação por 30 dias em tanque sob condições controladas (aeração constante, temperatura de 28°C, ciclos de 12 h claro/escuro, alimentação e limpeza da água a cada 72 h). Posteriormente, os exemplares de cada uma das espécies foram divididos em 4 aquários de 108 litros com 15 animais cada. O fipronil (CAS No. 120068-37-3) foi dissolvido na água em três concentrações: 0,05 µg/l; 0,10 µg/l e 0,23 µg/l. O método para contaminação foi subcrônico (60 dias) e semi-estático (1/3 da água e do contaminante renovados a cada 72 horas). Ao término do período de exposição os peixes foram anestesiados (benzocaína 10%, Merck), coletados dados relativos ao peso e comprimento total, tendo posteriormente sido retirados: sangue (teste do micronúcleo pisco e ensaio cometa); fígado (atividade enzimática de GST e medição de LPO); cérebro e músculo (atividade da acetilcolinesterase). O sangue para o ensaio cometa foi mantido em soro bovino fetal, refrigerado e na ausência de luz segundo RAMSDORF et al (2009b). Os demais tecidos (fígado, cérebro e músculo) para as

análises bioquímicas, foram mantidos em tubo de microcentrífuga em gelo e posteriormente transferidos para freezer -70°C.

Exemplares de *Danio rerio* (N=120) foram também adquiridos comercialmente, mantidos por aclimação por 30 dias e submetidos às mesmas condições experimentais citadas anteriormente, porém em aquários de 20 litros, com 30 exemplares em cada aquário, devido ao porte muito menor destes em relação aos lambaris e jundiás. No momento do sacrifício, após anestesia com benzocaína 10% (Merck), as brânquias dos peixes foram coletadas e mantidas em soro bovino fetal, na ausência de luz e refrigeradas para o ensaio cometa e o restante do corpo foi colocado em tubos de microcentrífuga, mantidos em gelo e posteriormente transferidos para freezer -70°C para a análise de biomarcadores bioquímicos.

2.2 Metodologia

Biomarcadores Genéticos

Em jundiás e lambaris, o teste do micronúcleo písceo em hemácias periféricas foi realizado segundo a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975). Na análise, além da frequência de micronúcleos, também foram computadas as alterações morfológicas nucleares descritas por CARRASCO; TILBURY; MYERS (1990).

O ensaio cometa foi realizado com sangue periférico (eritrócitos) de jundiás e lambaris como descrito previamente por SPEIT e HARTMANN (1999). Brevemente, 10 µl do sangue armazenado em 1 ml de soro bovino fetal foi diluído em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e colocado em uma lâmina coberta por agarose normal. As lâminas foram mantidas em uma solução de lise (solução de lise estoque: NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (1%); solução de lise uso: triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque), por 24 h em 4°C, na ausência de luz. Na seguinte etapa, as lâminas foram primeiramente imersas em uma solução de NaOH (10 N) e de EDTA (200 mM), pH 13 por 30 min, para efetuar a desnaturação do DNA, e submetido então à eletroforese a 300 mA, 25 V por 25 min. Após a neutralização em 0,4 M Tris, pH 7,5 e fixação no álcool etílico por 10 min, as lâminas foram coradas com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e analisados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Cem cometas em cada lâmina foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes, predefinidas no que diz respeito à intensidade da cauda, e a cada cometa foi dado um valor de 0, 1, 2, 3, ou 4 (de não danificado -0- ao dano máximo -4) (COLLINS et al., 1997). O escore foi obtido através do somatório das multiplicações do número de danos pelo valor do dano.

Em *Danio rerio*, o ensaio cometa foi realizado com brânquias. Nesse caso, foram retirados os três arcos branquiais dos lados direito e esquerdo, mantidos em soro bovino fetal (500 µl), refrigerados e desagregados usando homogeneizador do tipo Potter. Para a montagem das lâminas, foram utilizados 50 µl do homogeneizado e 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão. Além dessas modificações, que buscavam número adequado de células nas lâminas, o restante do procedimento seguiu-se ao descrito acima.

Biomarcadores Bioquímicos

Amostras de músculo e de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M) (pH 7,5), e centrifugadas a 10.000xg por 20 min a 4°C. As alíquotas destes sobrenadantes (fração S9) foram mantidas em freezer -70°C para posterior análise da atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral, bem como alíquota para determinação de proteínas. Amostras de fígado foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato (0,1 M) (pH 6,5), e centrifugadas a 10.000xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante (S9) foi aliqotado em tubos de microcentrífuga e mantidos em freezer -70°C até o momento das análises: atividades da glutathione S-transferase (GST) e determinação da peroxidação lipídica (LPO) para jundiás e lambaris. Em *Danio rerio*, o corpo de cada exemplar (com exceção das brânquias coletadas para o ensaio cometa) foi homogeneizado em tampão fosfato pH 6,5 e centrifugado. O sobrenadante, aliqotado, foi mantido em freezer -70°C até o momento das análises da atividade da acetilcolinesterase, glutathione S-transferase e lipoperoxidação.

Atividade da acetilcolinesterase em cérebro e em músculo foi determinada usando a técnica colorimétrica descrita por ELLMAN et al. (1961) e adaptada para microplaca (SILVA DE ASSIS, 1998). Iodeto de acetiltiocolina (ATC) 9 mM foi usado como substrato e 5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoato (DTNB) 0,75 mM como reagente de cor. A densidade óptica a 405 nm foi medida usando um leitor de placas. Os resultados foram expressos em nmol de tiocolina formada/min/mg proteína.

Para medir a atividade da GST em fígado, a fração S9 foi obtida e a atividade global de GST foi medida em espectrofotômetro em jundiás utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 3 mM e glutathione reduzida (GSH) 3 mM como substratos (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976) e para lambaris e peixe zebra GSH 2 mM e CDBN 2,5 mM. Aumento de absorbância foi imediatamente medido a 340 nm por 2 minutos em intervalos de 12 segundos. A atividade da enzima foi calculada como nmol 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno conjugado formado/min/mg de proteína.

Para análise de LPO em fígado, amostras foram diluídas em metanol 90% e centrifugadas. O sobrenadante foi adicionado em microplacas, juntamente com a solução reação (0,1 mM laranja de xilenol, 25 mM ácido sulfúrico, 4,0 mM BHT butil hidroxitolueno e 0,25 mM sulfato ferroso amoniacal) e incubados por 30 min. Em seguida, as amostras foram lidas a 570 nm (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992) em espectrofotômetro e os níveis de LPO foram expressos em nmoles de hidroperóxidos /mg de proteínas.

A concentração de proteína através do método de BRADFORD (1976), em 595 nm, usando albumina bovina do soro (BSA) como padrão.

2.3 Análise estatística

Nos biomarcadores genéticos (testes de micronúcleo písceo e ensaios cometa com sangue), para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunns. Nos biomarcadores bioquímicos (AchE cerebral e muscular, GST e LPO), análise de variância de uma via, seguida de Bonferroni, foi utilizada, para relação entre grupos controle e contaminados. Precedente às análises dos biomarcadores bioquímicos, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da amostra. A correlação entre atividade de AchE no músculo e o comprimento total dos peixes e o peso destes foi analisada pela correlação de Pearson. Os dados foram analisados por GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Todos os testes foram reconhecidos como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 *Rhamdia quelen*

Foi observada mortalidade de somente dois indivíduos no decorrer do experimento, o que representou 3,33% dos animais, mortalidade esta observada no em indivíduos do grupo controle. Os exemplares da espécie *R. quelen* ao final do bioensaio apresentavam-se dentro normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total. As médias das massas corpóreas foram 33,90 g no grupo controle; 39,06 g no grupo exposto à concentração 0,05 $\mu\text{g/l}$; 34,73 g no grupo exposto à concentração 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 32,95 no grupo exposto à concentração 0,23 $\mu\text{g/l}$. As médias dos comprimentos foram 17,43 cm no grupo controle e 18,50; 17,83 e 17,78 cm nos grupos expostos às concentrações 0,05, 0,10 e 0,23 $\mu\text{g/l}$, respectivamente.

No ensaio do micronúcleo písceo em jundiás (*Rhamdia quelen*) foram observadas diversas alterações morfológica nucleares (Figura 01) que foram somadas ao número de MN. A análise estatística mostrou que não houve diferença entre o grupo controle e a concentração 0,05 µg/l ($p=0,32$) nem entre as concentrações de 0,10 µg/l e 0,23 µg/l ($p=0,38$). Porém, foi observada diferença entre o grupo controle e a concentração de 0,10 µg/l ($p=0$); entre controle e concentração de 0,23 µg/l ($p=0$); entre as concentrações 0,05 µg/l e 0,10 µg/l ($p=0,02$) e entre as concentrações de 0,05 µg/l e 0,23 µg/l ($p=0$) (Figura 02a). Os animais expostos às concentrações 0,10 µg/l e 0,23 µg/l apresentaram maiores índices na frequência de micronúcleo e alterações morfológicas nucleares, indicando um possível efeito do contaminante nas células do sangue. Observando as medianas obtidas nessas análises, verificamos também um efeito dose-resposta (mediana do grupo controle = 5,46 e medianas nos grupos expostos às concentrações 0,05 µg/l; 0,10 µg/l e 0,23 µg/l foram de 7,4; 11,6 e 15,67 respectivamente).

Na análise dos dados para o ensaio cometa com sangue não foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle e a concentração de 0,05 µg/l ($p=0,89$) nem entre as concentrações 0,10 µg/l e 0,23 µg/l ($p=0,248$). Foi observada diferença entre o controle e a concentração de 0,10 µg/l ($p=0$); controle e concentração de 0,23 µg/l ($p=0,04$); entre as concentrações 0,05 µg/l e 0,10 µg/l ($p=0$) e entre as concentrações 0,05 e 0,23 µg/l ($p=0,02$) (Figura 02b).

Em jundiás (*Rhamdia quelen*) foi possível observar que a atividade da acetilcolinesterase no cérebro foi diferente entre os grupos controle (média \pm erro padrão da média = $107,5 \pm 12,65$ nmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹) e expostos ao fipronil, apresentando para as concentrações de 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l as atividades enzimáticas $159,6 \pm 5,22$; $146,1 \pm 6,52$ e $194,3 \pm 10,14$ nmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹, respectivamente (Figura 03). O resultado observado mostrou efeito de estímulo dose-dependente, pois o aumento da concentração de exposição refletiu em aumento da atividade da enzima no cérebro dos jundiás.

Entretanto, a análise da atividade da acetilcolinesterase no músculo não mostrou diferença do grupo controle em relação aos grupos expostos às concentrações. A atividade da acetilcolinesterase (média \pm erro padrão da média) do grupo controle foi $241,3 \pm 24,92$ nmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹. Os grupos de concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l apresentaram atividade enzimática $192,2 \pm 14,19$; $202,3 \pm 18,05$ e $192,3 \pm 12,13$ nmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹, respectivamente (Figura 03). Não foi observada correlação entre a atividade da AchE no músculo em relação ao comprimento total nem ao peso dos peixes.

Na análise da Glutathione S-Transferase não foi possível observar diferença entre o controle ($44,74 \pm 4,89 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$) e as concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$ e 0,10 $\mu\text{g/l}$ ($46,42 \pm 3,81$ e $48,78 \pm 2,95 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente). Entretanto, foi possível observar aumento significativo na atividade da GST na concentração de 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($72,62 \pm 9,99 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$) (Figura 03).

Quanto aos níveis de peroxidação lipídica (LPO) não houve diferença entre os grupos controle e expostos. Os níveis de peroxidação lipídica (média \pm erro padrão da média) foram de $7,97 \pm 1,48 \text{ nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo controle; $5,42 \pm 0,70 \text{ nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo de contaminação 0,05 $\mu\text{g/l}$; $5,28 \pm 0,53 \text{ nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo de contaminação 0,10 $\mu\text{g/l}$ e $7,65 \pm 0,77 \text{ nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo de contaminação 0,23 $\mu\text{g/l}$ (Figura 03).

3.2 *Astyanax sp*

Foi observada mortalidade de cinco indivíduos no decorrer do experimento, o que representou 8,33% dos animais. Esta mortalidade ocorreu nos grupos expostos às concentrações 0,05 e 0,23 $\mu\text{g/l}$ (3 e 2 indivíduos, respectivamente). Os exemplares da espécie *Astyanax sp* ao final do bioensaio apresentavam-se dentro normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total. As médias das massas corpóreas foram 7,23 g no grupo controle; 7,84 g no grupo exposto à concentração 0,05 $\mu\text{g/l}$; 8,08 g no grupo exposto à concentração 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 8,03 g no grupo exposto à concentração 0,23 $\mu\text{g/l}$. As médias dos comprimentos foram 9,74 cm no grupo controle e 8,8; 9,1 e 9,06 cm nos grupos expostos às concentrações 0,05, 0,10 e 0,23 $\mu\text{g/l}$, respectivamente.

A análise dos biomarcadores genéticos em lambaris (*Astyanax sp*) mostra que no teste do micronúcleo pisco foram observadas alterações morfológicas nucleares (Figura 04) e que somadas ao MN, não apresentaram diferença entre o grupo controle em relação aos grupos expostos ($p=0,19$ entre controle e 0,05 $\mu\text{g/l}$; $p=0,09$ entre controle e 0,10 $\mu\text{g/l}$ e $p=0,18$ entre controle e 0,23 $\mu\text{g/l}$). Também não foi observada diferença significativa entre as concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$ e 0,10 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,78$). Entretanto, foi observada diferença entre as concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,01$) e entre 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($p=0$) (Figura 05a).

Na análise dos dados do ensaio cometa com sangue de lambaris foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle e as concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$, 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ e entre as concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$ e 0,10 $\mu\text{g/l}$ ($p=0$ em todas as comparações). Porém não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,28$) e entre as concentrações 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,15$) (Figura 05b).

Em *Astyanax sp* (lambaris) a atividade da acetilcolinesterase no cérebro não apresentou diferença entre os grupos controle e expostos à contaminação, em nenhuma das concentrações. A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $28,87 \pm 2,26$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$; 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ foi $31,30 \pm 3,44$; $35,80 \pm 3,22$ e $36,03 \pm 2,52$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente (Figura 06).

Com relação a atividade da AchE no tecido muscular foi observada diferença entre o grupo controle (média \pm erro padrão da média = $45,14 \pm 4,01$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$) e os grupos expostos às concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$; 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ de fipronil ($18,97 \pm 1,29$; $19,08 \pm 3,13$ e $29,31 \pm 2,36$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente). Comparando os grupos, houve uma inibição da AchE no músculo nos grupos expostos. Porém não foi observada diferença entre as concentrações (Figura 06).

Em relação ao peso não foi observada correlação com atividade da colinesterase no músculo. Porém, em relação ao comprimento total, foi observada correlação positiva ($R^2=0,139$), sendo maior o comprimento, maior a atividade da colinesterase no músculo.

Com relação à atividade da GST, foi observado aumento na atividade da GST na comparação entre grupo controle (média \pm erro padrão da média = $8,68 \pm 1,14$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$) e grupos expostos às concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$; 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($16,40 \pm 2,16$; $15,51 \pm 1,63$ e $17,83 \pm 3,46$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente). Porém, não houve diferença de atividade entre as concentrações (Figura 06).

Quanto aos níveis de peroxidação lipídica (LPO) não houve diferença entre os grupos controle e contaminados. Os níveis de peroxidação lipídica (média \pm erro padrão da média) foram de $51,73 \pm 7,37$ $\text{nmoles}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ no grupo controle; de $42,20 \pm 4,87$ $\text{nmoles}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,05 $\mu\text{g/l}$; de $37,19 \pm 4,50$ $\text{nmoles}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,10 $\mu\text{g/l}$ e de $43,89 \pm 6,19$ $\text{nmoles}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,23 $\mu\text{g/l}$. (Figura 06).

3.3 *Danio rerio*

Em *Danio rerio*, quando analisamos os danos observados no ensaio cometa com brânquias, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos controle e 0,05 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,10$), controle e 0,10 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,89$), controle e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,10$) nem entre as concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$ e 0,10 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,08$) e 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($p=0,14$) apenas foi observada diferença significativa entre 0,05 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($p=0$). As medianas dos escores nos grupos controle e concentrações 0,05 $\mu\text{g/l}$; 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ de fipronil foram respectivamente 340, 365, 361 e 303 (Figura 07).

Em *Danio rerio*, observou-se diferença na atividade da acetilcolinesterase dos grupos controle (média \pm erro padrão da média = $72,32 \pm 13,86$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$) em relação às concentrações 0,10 $\mu\text{g/l}$ ($101,2 \pm 10,89$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$) e 0,23 $\mu\text{g/l}$ ($121,7 \pm 11,21$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$) enquanto que entre o grupo controle e concentração 0,05 $\mu\text{g/l}$ ($70,42 \pm 7,59$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$) não houve diferença. Pode-se perceber um aumento da atividade da enzima nos grupos de contaminação 0,10 $\mu\text{g/l}$ e 0,23 $\mu\text{g/l}$ (Figura 07).

Com relação à atividade da GST não houve diferença entre os grupos, observando-se a atividade enzimática (média \pm erro padrão da média) de $7,68 \pm 0,38$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo controle; $8,55 \pm 0,65$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,05 $\mu\text{g/l}$; $8,79 \pm 0,84$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,10 $\mu\text{g/l}$ e $8,93 \pm 0,67$ $\eta\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,23 $\mu\text{g/l}$ de fipronil (Figura 07).

Da mesma forma, também não foi observada diferença entre os grupos quanto aos níveis de peroxidação de lipídeos. Os níveis de peroxidação lipídica (média \pm erro padrão da média) foram de $41,93 \pm 4,46$ $\text{nmoles} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo controle; $52,22 \pm 3,72$ $\text{nmoles} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,05 $\mu\text{g/l}$; $44,63 \pm 2,43$ $\text{nmoles} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,10 $\mu\text{g/l}$ e $47,25 \pm 3,96$ $\text{nmoles} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ no grupo exposto a 0,23 $\mu\text{g/l}$ de fipronil. (Figura 07).

4. Discussão

A utilização de defensivos agrícolas, indiscutivelmente, tem contribuído para o aumento da produção agropecuária mundial. Entretanto, o uso indiscriminado destes compostos tóxicos, principalmente após a segunda guerra, tem causado um impacto negativo ao meio ambiente (RAND; PETROCELLI, 1985).

O consumo mundial de pesticidas tem chegado a 2,6 milhões de toneladas e deste total, 85% são utilizados na agricultura (WILSON; TISDELL, 2001). Considerando a América Latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de defensivos agrícolas, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região. A contaminação dos ambientes aquáticos por estes pesticidas oriundos das práticas agrícolas tornou-se um problema de grande importância mundial. A fim de avaliar alterações causadas por estes xenobióticos em organismos aquáticos, muitos estudos têm sido desenvolvidos para se avaliar alterações causadas por estes xenobióticos em organismos aquáticos (SANCHO et al., 2000; BRETAUD; TOUTANT; SAGLIO, 2000; OROPESA; GARCÍA-CAMBERO; SOLER, 2009).

O fipronil é aplicado com sucesso nas plantações de cana de açúcar, arroz (BALANÇA; DE VISSCHER, 1997), verduras e frutas (COLLIOT et al., 1992; ZHAO; WU; ZHU, 1995; STEVENS; HELLIWELL; WARREN, 1998), além da aplicação na medicina veterinária para o controle de parasitas externos (HAINZL; COLE; CASIDA, 1998). O fipronil atua diretamente no sistema nervoso central dos insetos, inibe o impulso nervoso normal por competição com o neurotransmissor ácido gama aminobutírico (GABA). Em meio aquático, o fipronil sofre degradação e transforma-se em outro produto, também tóxico, denominado desulfenil. Em estudos metabólicos observa-se que há um potencial de bioacumulação do desulfenil em tecidos gordurosos (DEMCHECK; SKROBIALOWSKI, 2003; CONNELLY, 2001). Em uma revisão sobre o fipronil, GUNASEKARA et al. (2007) concluíram que o composto classifica-se como altamente tóxico para várias espécies de organismos aquáticos.

Peixes estão entre os organismos mais indicados para o monitoramento de ambientes aquáticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Alterações biológicas em peixes que estão relacionadas à exposição ou aos efeitos dos contaminantes são chamadas de biomarcadores (PEAKALL, 1994) e seu uso tem levado a ótimos resultados na avaliação de risco ambiental (McCARTHY; SHUGART, 1990; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). No Brasil, ainda são poucos os trabalhos focando o uso de biomarcadores em espécies de peixe nativas como ferramentas para avaliação da qualidade da água (WILHELM-FILHO et al., 2001; WINKALER et al., 2001; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; MARTINEZ; SOUZA, 2002; AKAISHI et al., 2004; RAMSDORF et al. 2009a).

Em *Rhamdia quelen*, tanto no teste do micronúcleo písceo quanto no ensaio cometa com sangue foi observada diferença significativa entre o grupo controle e as concentrações 0,10 µg/l e 0,23 µg/l de fipronil, com os grupos expostos ao fipronil apresentando maiores índices na frequência de alterações morfológicas nucleares e de escores no ensaio cometa. Esses resultados indicam um provável efeito do fipronil nas células do sangue. Entre os jundiás controle e os expostos à concentração 0,05 µg/l de fipronil, não foi observada diferença significativa nos testes do micronúcleo písceo e ensaio cometa.

Em *Astyanax sp*, no teste do micronúcleo písceo não houve diferença entre o grupo controle em relação aos grupos contaminados, enquanto que no ensaio cometa com sangue foi observada diferença significativa entre os escores de danos do grupo controle e todas as concentrações de fipronil. Esse resultado indica que o ensaio cometa é mais sensível para detectar danos causados em sangue de lambaris expostos a baixas concentrações de fipronil. GRISOLIA (2002) observou aumento na frequência de micronúcleos em *T. rendalli* expostos

por injeção intraperitoneal a diversos pesticidas.

Dentre os componentes moleculares da célula, o DNA é um importante alvo do estresse ambiental nos organismos (FRENZILLI et al., 2001). Danos ao DNA podem levar a mutações, quebras na fita, bases alteradas (SHUGART, 2000), eventualmente carcinogênese e outras desordens na saúde do indivíduo em estudo (KURELEC, 1993). Além disso, pode conduzir a consequências severas em nível de indivíduo, nas espécies e no ecossistema (KLOBUCAR et al., 2003). Dessa forma, danos ao DNA devem ser considerados importantes em testes de toxicidade.

Vários trabalhos relatam a elevada sensibilidade do ensaio cometa para a detecção de danos ao material genético de peixes frente a pesticidas (KUMAR et al., 2010 com malathion; PANDEY et al., 2006 com endossulfano; CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008 com Roundup® entre outros), o que corrobora os resultados observados no presente trabalho.

Resultados de experimentos laboratoriais têm revelado que vários pesticidas possuem propriedades genotóxicas ou mutagênicas que constituem os fatores de risco iniciais na geração de efeitos carcinogênicos ou reprodutivos em longo prazo (BOLOGNESI, 2003).

A análise da atividade da acetilcolinesterase no músculo de *R. quelen* não mostrou diferença entre os grupos controle e expostos e no cérebro foi observada diferença entre os grupos controle e expostos ao fipronil, com o xenobiótico estimulando a atividade da enzima. ROSSI (2008) também observou atividade da acetilcolinesterase aumentada em músculo de *Astyanax sp* expostos ao herbicida hexaron WG® por 96 horas. A autora relata que os lambaris do grupo que apresentou essa atividade da acetilcolinesterase aumentada também apresentaram natação descoordenada, movimentos operculares lentos e redução da locomoção. A acetilcolinesterase é responsável pela inativação da acetilcolina na fenda sináptica, e conseqüente extinção do estímulo, levando da mesma forma a uma diminuição do sistema colinérgico. Com metais, ROMANI et al. (2003) também observou aumento significativo na atividade da AchE no cérebro e no músculo de *Sparus auratus* expostos ao cobre e PRETTO et al. (2010) observou aumento na atividade da AchE do músculo em *R. quelen* expostos ao cádmio. O aumento da atividade da AchE em animais expostos a contaminantes, entretanto, precisa ser melhor elucidado.

Em *Astyanax sp*, de maneira inversa ao observado em jundiás, o resultado da atividade da AchE no cérebro não apresentou diferença entre os grupos controle e expostos ao fipronil, enquanto que para o tecido muscular a atividade da AchE mostrou diferença entre o grupo controle e os três grupos expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l, com inibição da enzima nos grupos expostos ao fipronil.

A inibição da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima chave do sistema nervoso, resulta na acumulação da acetilcolina, que pode levar à citotoxicidade e aumentar a mobilidade de linfócitos e morte do organismo (SINGH et al., 2007) ou alterações no comportamento, em doses subletais (PEAKALL, 1992). A inibição da atividade da AChE tem sido amplamente usada em animais aquáticos para diagnosticar exposição à compostos anticolinesterásicos, como os pesticidas organofosforados e carbamatos (PEAKALL, 1992). Mais recentemente, diversos estudos têm indicado que as colinesterases também são sensíveis a outros tipos de contaminantes ambientais, tais como metais, detergentes e misturas complexas de poluentes (GILL; TEWARI; PANDE, 1990; PAYNE et al., 1996; GUILHERMINO et al., 1998; 2000).

MODESTO e MARTINEZ (2010) observaram atividade da AChE diminuída em cérebro de *Prochilodus lineatus* expostos por 96 horas ao Roundup[®], e também inibição da atividade da AChE no músculo 24 e 96 horas após exposição. DEMBÉLÉ, HAUBRUGE e GASPAR (2000) observaram inibição da AChE no cérebro de *Cyprinus carpio* por pesticidas organofosforados e carbamatos após exposições agudas (96 horas), CÉRON et al. (1996) observaram diminuição significativa em *Anguilla anguilla* expostas ao pesticida organofosforado diazinon, na concentração subletal de 0,042 mg/l em cérebro, plasma e olhos e GUIMARÃES; SILVA DE ASSIS; BOEGER (2007) observaram inibição da AChE muscular em *Oreochromis niloticus* 8 horas após de única aplicação de trichlorfon na dose recomendada na aquicultura (0,25 mg/l) para o tratamento de organismos parasitários. Exposição de *O. niloticus* à concentrações subletais de etoxazole, um novo pesticida organoflourine, levou à depleção de até 80% da atividade da AChE (SEVGILER et al., 2004). SILVA et al. (1993) mostraram que essa enzima permaneceu inibida 30 dias após uma única dose de organofosfato Folidol 600 na espécie de peixe *Callichthys callichthys*, nativa do Brasil.

É bem aceito que 20% ou maior inibição de AChE em aves, peixes e invertebrados indica exposição à inseticidas organofosforados (MAYER; ELLERSIECK, 1986). Entretanto, alguns animais são capazes de sobreviver com inibição superior a 50%, mas isso é um indicativo de situação que ameaça a vida (LUDKE; HILL; DIETEER, 1975).

Em relação ao comprimento total dos lambaris, foi observada correlação positiva com a atividade da AChE no músculo, sendo maior o comprimento, maior a atividade da enzima, contrariando resultados encontrados por STURM; SILVA DE ASSIS e HANSEN (1999) e KLEMMZ e SILVA DE ASSIS (2005), que observaram correlação negativa entre a acetilcolinesterase e peso e comprimento de peixes.

Na análise da Glutathione S-Transferase em jundiás foi possível observar aumento significativo na atividade da GST expostos ao fipronil somente na concentração de 0,23 µg/l, enquanto que em *Astyanax sp.*, foi possível observar aumento significativo da atividade da GST nos três grupos de contaminação, porém, não tendo sido observada diferença entre os grupos expostos às três concentrações.

A GST metaboliza carcinógenos, poluentes ambientais, drogas e um amplo espectro de outros xenobióticos (CNUBBEN et al., 2001). O uso de GST e outras enzimas de detoxificação de fase II da biotransformação como biomarcadores de exposição a xenobióticos orgânicos tem ganhado crédito no biomonitoramento de poluição aquática (LIVINGSTONE, 1998; PAYNE et al., 1987).

Atividade da GST aumentada no fígado tem sido relatada em várias publicações após exposição de peixes a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas e pesticidas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), à água contaminada com esgoto doméstico, metais pesados e compostos orgânicos (AHMAD et al., 2005; STEPHENSEN et al., 2005), e em peixes que habitam locais com forte influência antropogênica (VIGANO et al., 1998). O aumento da atividade da GST tem sido associado com uma adaptação defensiva do organismo contra uma variedade de compostos orgânicos presentes no ambiente (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Portanto os resultados obtidos com *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* no presente trabalho, corroboram com os obtidos em outras espécies de peixes, demonstrando que o fipronil, mesmo em concentrações aceitas pela legislação internacional, já provoca uma adaptação defensiva dos organismos.

Quanto à medição nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) tanto em *Rhamdia quelen* quanto em *Astyanax sp* não houve diferença entre os grupos controle e contaminados.

Danio rerio é a espécie de peixe frequentemente usado em estudos experimentais, com uso recomendado pela OECD (Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico) e os protocolos são normalizados para estudos toxicológicos (PARIS-PALACIOS; BIAGIANTI-RISBOURG, 2006).

Ao analisarmos os dados dos biomarcadores estudados na espécie de peixe exótica *Danio rerio*, o resultado do ensaio cometa com brânquias apresentou resultados inconsistentes. Nesta análise, os escores do ensaio cometa no grupo controle foram muito elevados (mediana dos escores: 340 no grupo controle). Esses resultados podem ter sido ocasionados pelo processo de desagregação do tecido. A metodologia do ensaio cometa com brânquias de *Danio rerio* foi adaptada, uma vez que não havia protocolo bem estabelecido

para essa análise. Nossos resultados indicam que mais esforços devem ser dedicados para que o ensaio cometa possa ser realizado com esse material sem a observação de danos tão elevados no DNA de indivíduos controles negativos. Entretanto cabe aqui ressaltar, que a mesma metodologia para desagregação de tecidos já foi utilizada e não foram observados danos elevados ao DNA em indivíduos do grupo controle (RAMSDORF et al., 2009a). Nesse trabalho, não realizamos o teste de viabilidade celular, que responderia se os danos no DNA observados nos indivíduos controle eram em razão da má preservação das amostras para a realização do ensaio cometa, tendo em vista que o protocolo utilizado para a preservação foi o recomendado para amostras de sangue e não de brânquias.

Em relação à atividade da acetilcolinesterase em *Danio rerio* observou-se diferença do grupo controle para os grupos expostos às concentrações 0,10 µg/l e 0,23 µg/l, com aumento da atividade da enzima nos grupos expostos ao fipronil. Na atividade da GST e nos níveis de peroxidação de lipídeos não foi possível observar diferença significativa entre os grupos.

Exposição crônica (250 dias) de *Danio rerio* ao parathion apresentou diminuição da acetilcolinesterase de maneira correlacionada à concentração do pesticida, mas não correlacionada com o tempo de exposição, resultado esse que suporta a hipótese de que a AchE é um biomarcador muito sensível de exposição, mas não prediz acuradamente sobre efeitos adversos de níveis mais elevados após exposição crônica aos organofosforados (ROEX; KEIJZERS; van GESTEL, 2003).

Com exceção à atividade da AchE, que apresentou aumento significativo nos grupos contaminados com as concentrações 0,10 µg/l e 0,23 µg/l, nos demais biomarcadores utilizados (ensaio cometa em brânquias, atividade de GST e LPO) não observamos efeito do fipronil em *Danio rerio*. Em *D. rerio*, o efeito do fipronil no desenvolvimento embrionário foi demonstrado por STEHR et al. (2006), com observação de degeneração da notocorda com a concentração de 333 µm/l na água, causado pelo encurtamento das fibras musculares na direção rostro-caudal, redução da transmissão interneural na medula espinal, com conseqüente morte por tetania.

BRAUNBECK et al. (1992) comparou as respostas tóxicas de *O. mykiss* e *Danio rerio* após exposição prolongada (3 meses) à atrazina e observou que o peixe zebra foi menos sensível aos efeitos tóxicos da atrazina. Tendo em vista que na espécie *D. rerio* somente a análise da AchE respondeu à presença do xenobiótico, podemos supor que essa espécie exótica apresenta menor sensibilidade ao fipronil nas concentrações utilizadas que as espécies nativas *R. quelen* e *Astyanax sp.*

Em crustáceos, *Amphiascus tenuiremis*, o fipronil causou diminuição do número de ovos de fêmeas e diminuiu a sobrevivência de machos em concentração ambientalmente realística de 0,63 µg/l (CARY et al., 2004). OBERDÖRSTER et al. (1999) observou em artrópodos reprodução e desenvolvimento atrasados em machos. Em peixes, INCARDONA et al. (2006), verificaram defeitos locomotores em embriões de *Danio rerio* expostos ao fipronil nas concentrações variando entre 0,2 e 1.2 µM.

O fipronil, nas concentrações utilizadas nesse trabalho e através dos biomarcadores genéticos e bioquímicos utilizados, apresentou toxicidade para as espécies nativas *R. quelen* e *Astyanax sp.* Em *R. quelen*, os biomarcadores que apresentaram resposta frente às concentrações de fipronil foram teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa, AchE cerebral e GST e em lambaris foram o ensaio cometa, AchE muscular e atividade de GST. Na espécie *D. rerio*, somente a AchE apresentou atividade alterada frente às concentrações. Concluimos assim, a necessidade de testar a toxicidade dos compostos nas espécies nativas, já que existem muitas diferenças de resposta entre as espécies e neste trabalho foi demonstrado que o jundiá e o lambari respondem a concentrações que a espécie exótica não responde de forma significativa.

Quanto às concentrações de fipronil testadas, a concentração 0,05 µg/l, a menor utilizada nesse trabalho, foi suficiente para induzir a atividade de AchE em *R. quelen* e na espécie *Astyanax sp* provocar quebras no DNA detectados através do ensaio cometa, inibir significativamente a atividade da AchE muscular e induzir a GST do fígado. As demais concentrações testadas também provocaram alterações em outros biomarcadores.

Desse modo, podemos concluir que, nas concentrações testadas, o fipronil apresentou toxicidade aos peixes nativos *R. quelen* e *Astyanax sp.* A concentração de fipronil em águas recomendada como segura pela Comunidade Européia (0,10 µg/l) apresenta riscos para a comunidade de peixes. A Legislação brasileira é ainda mais falha, uma vez que não apresenta limites para esse composto em águas continentais.

5. Referências Bibliográficas

As referências citadas no capítulo II se encontram com as demais, no final da tese.

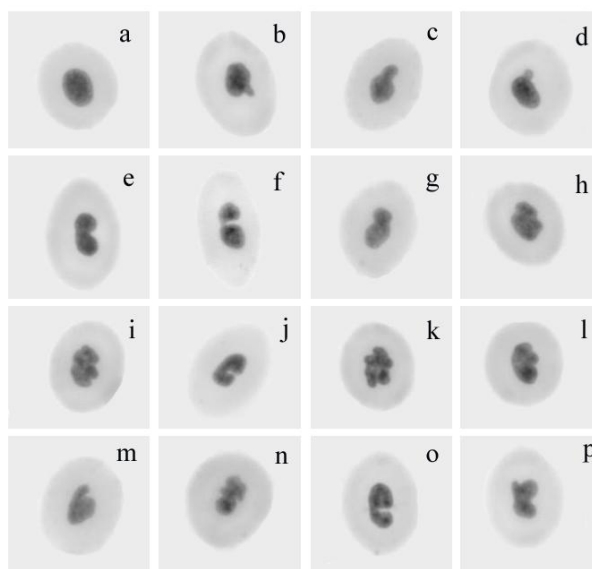


Figura 01 - Célula com núcleo normal (a) e células com alterações morfológicas nucleares (b-p) observadas nos exemplares de *Rhamdia quelen* expostos ao fipronil. Aumento de 1.000x.

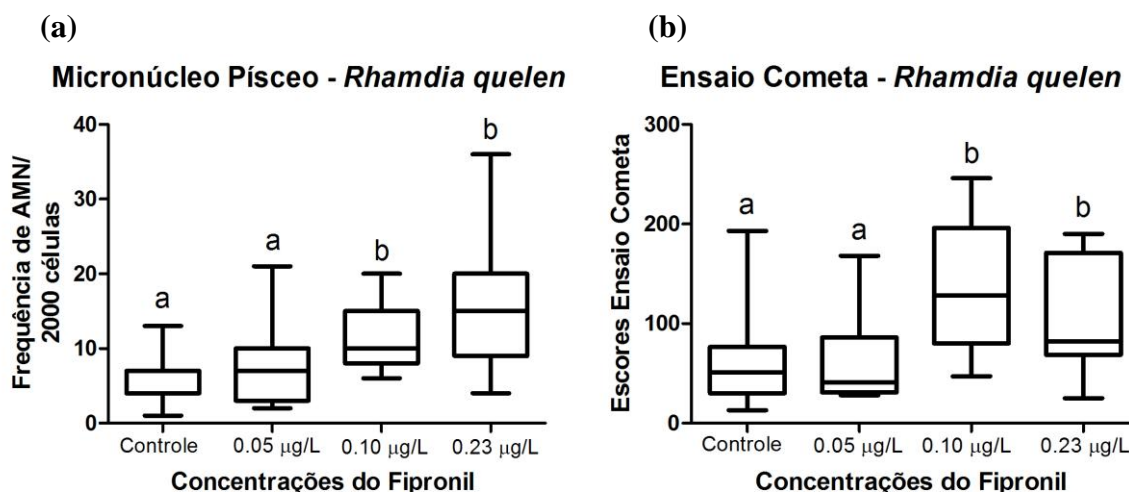


Figura 02 - Biomarcadores Genéticos em *R. quelen*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil; e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

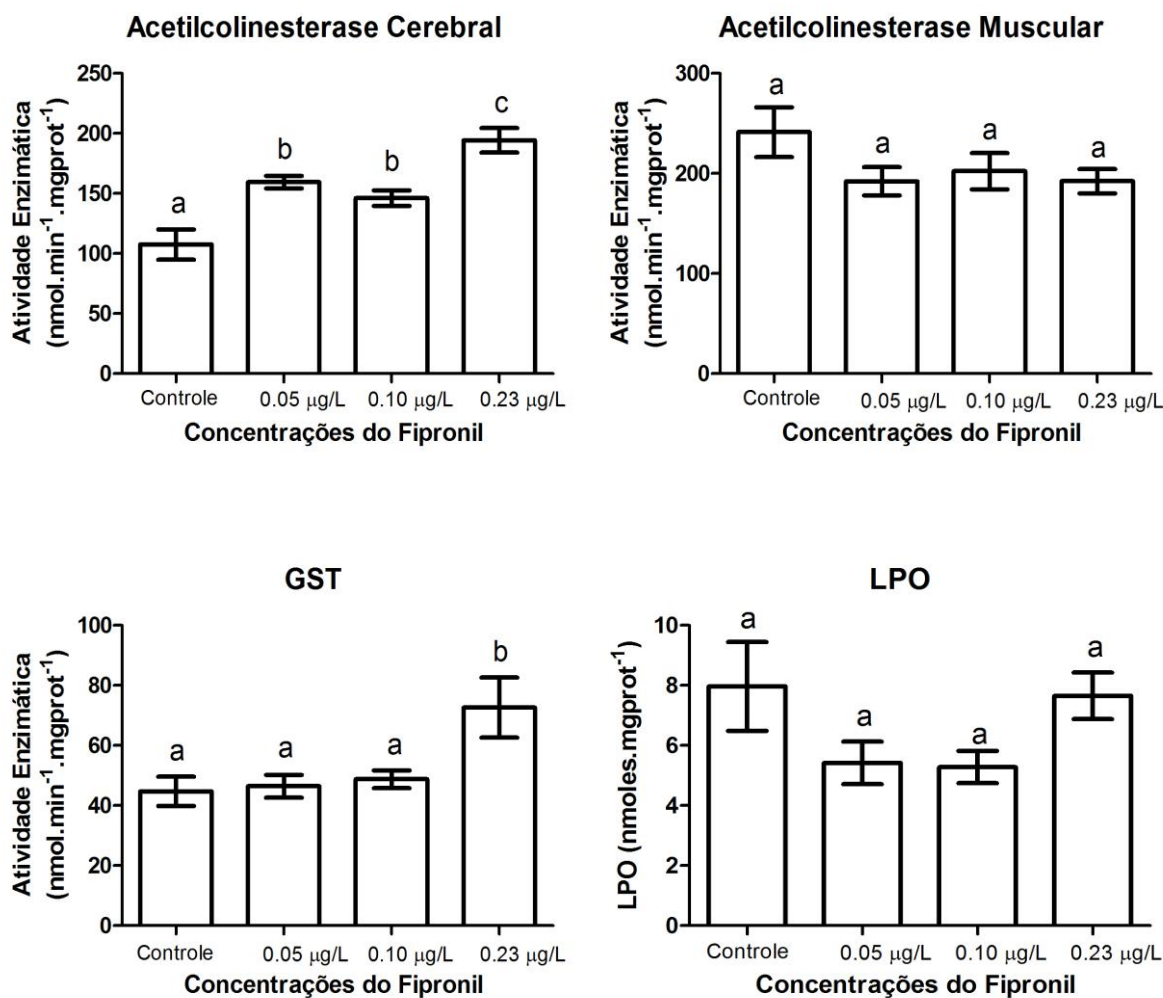


Figura 03 - Biomarcadores Bioquímicos em *Rhamdia quelen*. Acetilcolinesterase Cerebral e muscular; Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

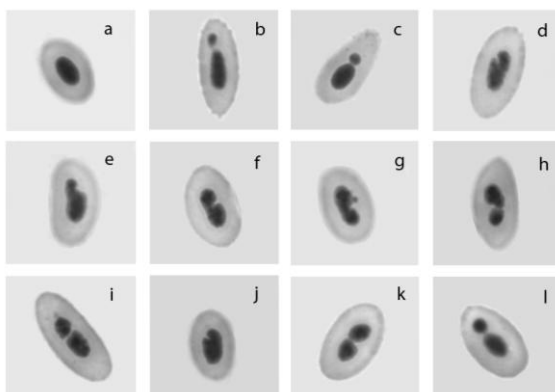


Figura 04 - Célula com núcleo normal (a), célula micronucleada (b) e células com alterações morfológicas nucleares (c-l) observadas nos exemplares de *Astyanax sp* expostos ao fipronil. Aumento de 1.000x.

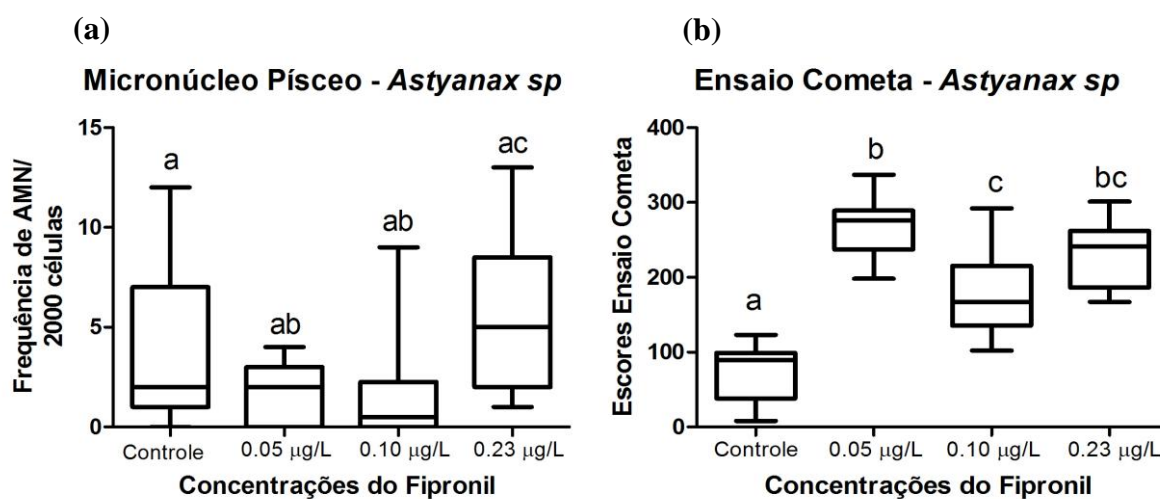


Figura 05 - Biomarcadores Genéticos em *Astyanax sp*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

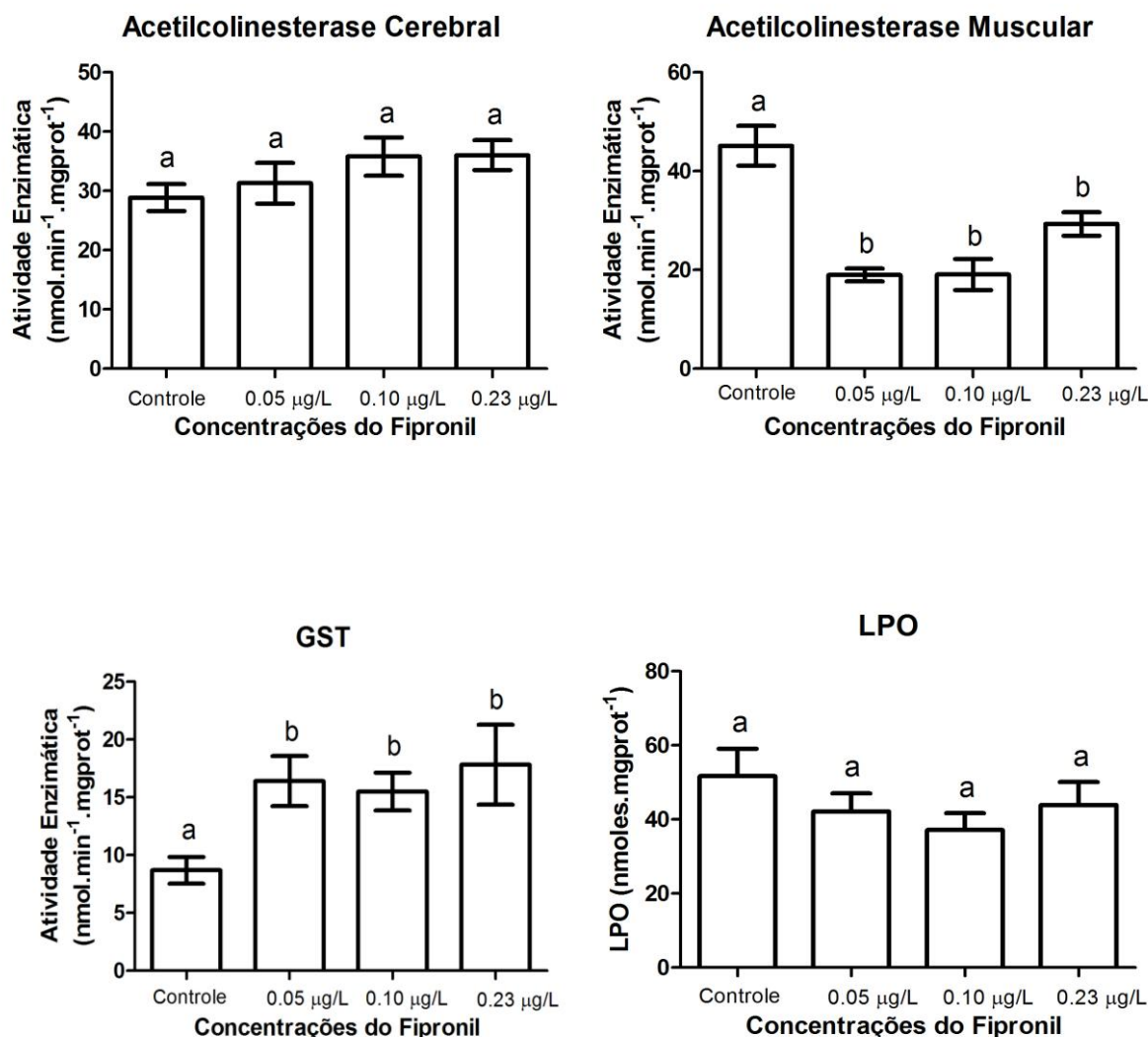


Figura 06 - Biomarcadores Bioquímicos em *Astyanax sp.* Acetilcolinesterase Cerebral e muscular; Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

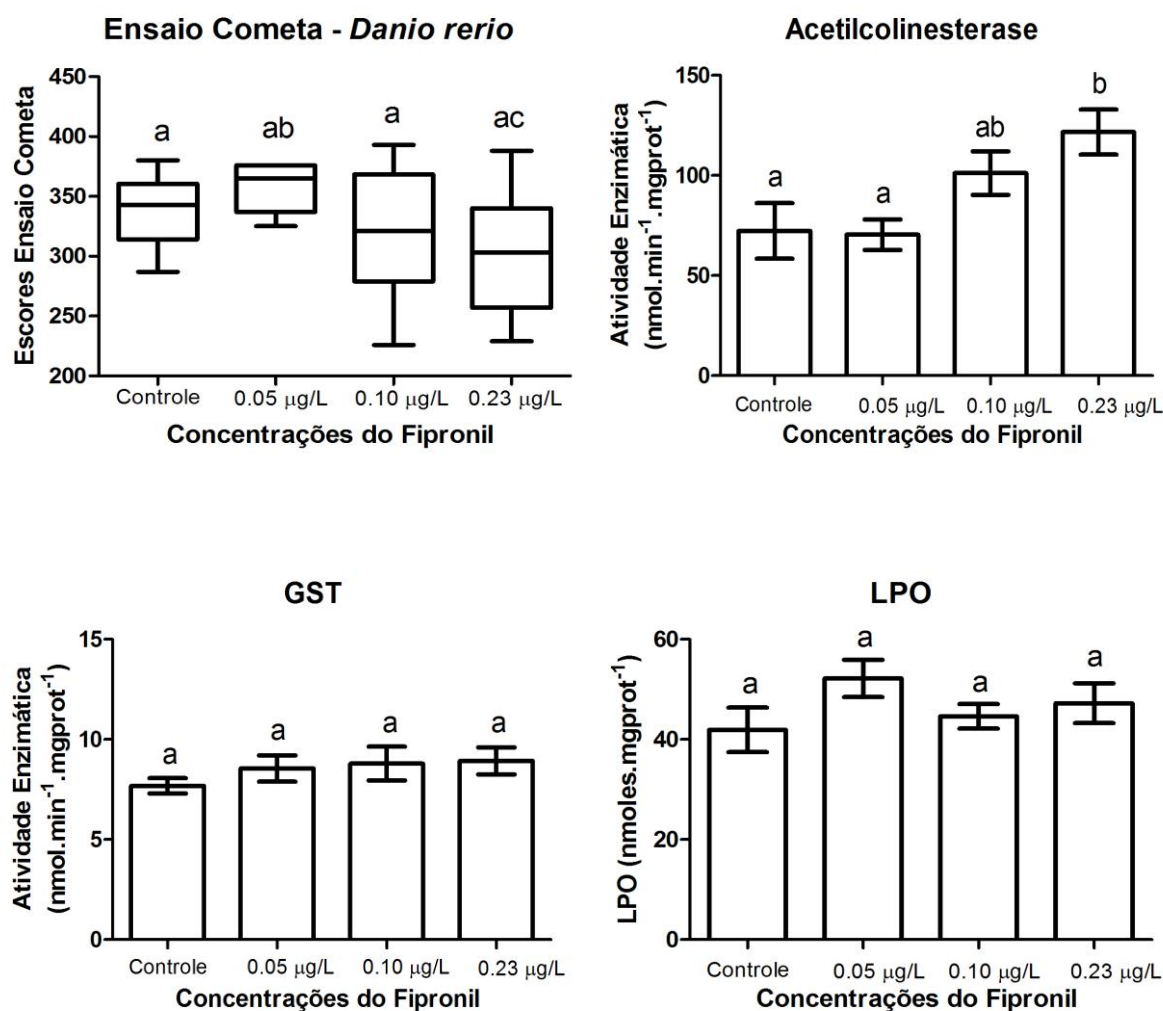


Figura 07 - Biomarcadores Genéticos e Bioquímicos em *Danio rerio*. Escores obtidos no ensaio cometa com brânquias; atividade da Acetilcolinesterase e da Glutathione S-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle e expostos às concentrações 0,05; 0,10 e 0,23 µg/l de fipronil. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

CAPÍTULO III

Avaliação da toxicidade subcrônica (30 dias) do nitrato de chumbo em *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos

Resumo

O chumbo é altamente tóxico e seus efeitos biológicos conhecidos são sempre deletérios. A absorção de chumbo por organismos aquáticos pode ocorrer através da pele, brânquias, além da via alimentar. O objetivo do presente trabalho foi verificar a toxicidade subcrônica, por 30 dias, do chumbo inorgânico em três concentrações: 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,10 mg/l. Os biomarcadores empregados foram: genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares e danos ao DNA pelo ensaio cometa alcalino do sangue), bioquímicos (de neurotoxicidade: Acetilcolinesterase em cérebro e em músculo, AchE cerebral e muscular; de biotransformação: Glutathione *S*-transferase - GST- e Etoxiresorufina-*O*-deetilase - EROD - ; e de Estresse Oxidativo: Peroxidação lipídica, LPO), nas espécies de peixes nativas *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp.* Em *R. quelen*, observou-se que as concentrações 0,03 e 0,1 mg/l de nitrato de chumbo aumentaram os níveis de quebras no DNA; as concentrações 0,01 e 0,1 mg/l diminuíram os níveis de LPO e as três concentrações testadas (0,01; 0,03 e 0,1 mg/l) induziram aumento na atividade da AchE muscular e reduziram a atividade da EROD em relação ao grupo controle. No teste do micronúcleo pisco, na atividade da AchE cerebral e na atividade da GST não foram observadas alterações em *R. quelen*. Em *Astyanax sp.*, as três concentrações de chumbo inorgânico testadas (0,01; 0,03 e 0,1 mg/l) promoveram quebras no DNA e alteraram as atividades das enzimas AchE muscular (aumento da atividade nos grupos expostos ao chumbo) e GST (diminuição da atividade da enzima nos grupos contaminados). A concentração 0,03 mg/l diminuiu a atividade da AchE cerebral em relação aos demais grupos e a concentração 0,1 mg/l promoveu aumento na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares. Na atividade da EROD e nos níveis de LPO não foram observadas diferenças entre os grupos controle e contaminados. Nossos resultados indicam elevado potencial tóxico do chumbo inorgânico em espécies de peixe nativas (*R. quelen* e *Astyanax sp.*), tanto na concentração recomendada como segura 0,01 mg/l, o limite aceito em águas pelo CONAMA (2005) e pela WHO (1993) como nas concentrações encontradas no ambiente (0,03 e 0,1 mg/l).

1. Introdução

Dentre os poluentes, os metais potencialmente tóxicos representam um grupo especial, pois não são degradados, de forma natural, química ou biologicamente. A presença de metais potencialmente tóxicos no ambiente aquático e em concentrações elevadas pode causar a morte de animais e organismos fotossintetizantes. Altas concentrações de metais afetam

organismos bentônicos, que são capazes de bioconcentrar esses contaminantes, causando efeito direto na cadeia alimentar aquática (ALEGRE, 2009).

Metais são capazes de perturbar a integridade dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos dos peixes, que são, não somente componentes importantes do ecossistema, mas também usados como fonte de alimento (HOGSTRAND et al., 1999; BASHA; RANI, 2003). Os tecidos dos peixes, especificamente fígado e rim, são dotados de sistemas de defesas antioxidantes para proteção contra danos oxidativos causados por metais (BASHA; RANI, 2003; ATLI; CANLI, 2008). Níveis elevados de metais podem induzir estresse oxidativo gerando espécies de oxigênio reativas, que podem oxidar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, conduzindo frequentemente a danos na estrutura da célula ou mesmo morte celular (NAGALAKSHMI; PRASAD, 1998; DEWEZ et al., 2005; CAO et al., 2010).

O chumbo é um metal de cor branca acinzentada, brilhante, dúctil, macio e muito resistente à corrosão. É um elemento não essencial que ocorre naturalmente no ambiente. Entretanto, as concentrações mais elevadas encontradas na natureza são resultado de atividades humanas. Muitas das suas propriedades físicas e químicas como maleabilidade, ductilidade, pobre condutibilidade e resistência à corrosão, têm favorecido o uso do chumbo para uma grande variedade de aplicações pelo homem desde tempos antigos (GARCÍA-LESTÓN et al., 2010).

A entrada de chumbo em corpos de água ocorre principalmente por descargas industriais diretas e deposição de partículas aéreas, sendo observadas as maiores concentrações do metal em águas próximas aos grandes centros urbanos (PAIN, 1995). O chumbo é altamente tóxico e seus efeitos biológicos conhecidos são sempre deletérios. A forma química e sua concentração na água e nos sedimentos são os fatores que influenciam a taxa de absorção desse metal (PATTEE; PAIN, 2002).

Quanto à forma química do chumbo, ambas as formas, inorgânica e orgânica, são utilizadas em diversos processos industriais (JOHNSON, 1998). A forma inorgânica é menos tóxica que a forma orgânica, já que a membrana plasmática é permeável ao organometal. Porém, a quantidade de chumbo na forma inorgânica que circula nos ecossistemas é maior do que a quantidade de chumbo orgânico (PAIN, 1995), sendo, portanto a forma inorgânica a que mais causa problemas ambientais.

A agência internacional para a pesquisa sobre o câncer (IARC) classificou o chumbo como possível carcinógeno humano (grupo 2B) (IARC, 1987) e compostos inorgânicos de chumbo como prováveis carcinógenos humanos (grupo 2A) (IARC, 2006). Em alguns estudos epidemiológicos a exposição ao chumbo foi associada a um aumento na incidência de alguns

cânceres como de estômago, pulmão e bexiga (FU; BOFFETTA, 1995). O chumbo pode causar efeitos adversos à saúde que inclui neurotoxicidade, nefrotoxicidade e efeitos deletérios nos sistemas hematológicos e cardiovasculares (ATSDR, 2007), inibição de enzimas, mutações, aberrações cromossômicas, câncer e defeitos congênitos (JOHNSON, 1998).

A absorção de chumbo por organismos aquáticos pode ocorrer através da pele, brânquias, além da via alimentar (TAO et al., 1999). PAIN (1995) observou inibição da atividade de enzimas hematopoiéticas no peixe *Pleuronectes platessa* em baixas concentrações de chumbo na água (10 µg/l). Em elevadas concentrações, foram observados quadros anêmicos, redução na eclosão de ovos e curvatura lateral da espinha e em doses letais, o chumbo induziu aumento na produção de muco, resultando na obstrução das brânquias, o que pode resultar na morte do animal (PAIN, 1995).

Peixes estão entre os organismos mais indicados para monitoramento da qualidade ambiental de ambientes aquáticos, pois ocupam diferentes níveis na cadeia trófica, sofrem bioacumulação, respondem aos agentes químicos em baixas concentrações e respondem como os mamíferos frente aos agentes tóxicos (GOKSOYR et al., 1991). Entretanto, poucos estudos de toxicidade usando espécies de peixes de água doce nativas da América do Sul estão disponíveis (WILHELM FILHO et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; RABITTO et al., 2005; RAMSDORF et al., 2009a)

Rhamdia quelen, ou jundiá, pertencente à família Heptapteridae (NELSON, 2006), apresenta distribuição neotropical, do sul do México ao centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma espécie nativa promissora para o cultivo, com rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES et al., 2000). É uma espécie resistente ao inverno e apresenta rápido crescimento no verão (BARCELLOS et al., 2003). PRETTO et al. (2010) observaram que *R. quelen* apresenta maior sensibilidade à contaminação por metais que espécies exóticas.

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto por Baird & Girard (1854) e a revisão mais recente cita 86 espécies (LIMA et al., 2003). Pertencente à família Characidae (FINK; FINK, 1981), popularmente conhecidos por lambaris, são utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Apresenta grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Espécies do gênero *Astyanax* têm sido consideradas como zooplantívoras, insetívoras e onívoras com papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas (SANTOS, 1981).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a toxicidade subcrônica (30 dias) do nitrato de chumbo em contaminação semi-estática por imersão, em três diferentes concentrações: 0,01 mg/l (limite aceito em águas classes 1 e 2 pelo CONAMA - Resolução No. 357 de 2005 - e limite aceito pela WHO, 1993) e duas concentrações ambientalmente realísticas segundo LENNTECH (2010): 0,03 mg/l e 0,10 mg/l. Os biomarcadores empregados foram: genéticos (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares foram unidos como teste do micronúcleo písceo e danos ao DNA pelo ensaio cometa alcalino do sangue) e bioquímicos (de neurotoxicidade: Acetilcolinesterase em cérebro e em músculo; de biotransformação: Glutathione *S*-transferase e Etoxiresorufina-*O*-deetilase; e de Estresse Oxidativo: Peroxidação lipídica), nas espécies de peixes nativas *Rhamdia quelen* (espécie de fundo) e *Astyanax sp* (espécie de coluna d'água).

2. Material e métodos

2.1 Exposição

Em experimentos separados, exemplares de jundiás juvenis (*Rhamdia quelen*) (N=60) e de lambaris (*Astyanax sp*; N=60) foram adquiridos comercialmente e mantidos para aclimação por 30 dias em tanques de 250 litros sob condições controladas (aeração constante, temperatura de 28°C, ciclos de 12 h claro/escuro, alimentação e limpeza da água a cada três dias). Posteriormente, os animais foram divididos em 4 aquários de 108 litros com 15 animais cada um deles. O contaminante nitrato de chumbo (CAS No. 10099-74-8) foi dissolvido na água em três concentrações: 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,10 mg/l. O método para contaminação foi por imersão, subcrônico (30 dias) e semi-estático (1/3 da água e do contaminante renovados a cada 72 horas).

Ao término do período de contaminação (30 dias), os peixes foram anestesiados (benzocaína 10%, Merck), pesados e medidos, tendo posteriormente sido retirados: sangue (teste do micronúcleo písceo e ensaio cometa); fígado (atividades enzimáticas de EROD, GST e medição de LPO); cérebro e músculo (atividade da acetilcolinesterase).

O sangue para o ensaio cometa foi mantido em soro bovino fetal, refrigerado e na ausência de luz segundo RAMSDORF et al. (2009b). Os demais tecidos (fígado, cérebro e músculo) foram mantidos em gelo e posteriormente transferidos para freezer -70°C.

2.2 Metodologia

Biomarcadores Genéticos

O teste do micronúcleo písceo em hemácias periféricas foi realizado segundo a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975). Na análise, além da frequência de micronúcleos, também foram computadas as alterações morfológicas nucleares descritas por CARRASCO; TILBURY; MYERS (1990).

O ensaio cometa foi realizado com sangue periférico (eritrócitos) como descrito previamente por SPEIT e HARTMANN (1999). Resumidamente, 10µl do sangue armazenado em 1 ml de soro bovino fetal foi diluído em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e colocado em uma lâmina coberta por agarose normal. As lâminas foram mantidas em uma solução de lise (solução de lise estoque: NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8 %), N-lauril-sarcosinato (1%); solução de lise uso: triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque), por 24 h em 4°C, na ausência de luz. Na seguinte etapa, as lâminas foram primeiramente imersas em uma solução de NaOH (10 N) e de EDTA (200 mM), pH 13 por 30 minutos, para efetuar a desnaturação do DNA, e submetido então à eletroforese a 300 mA, 25 V por 25 min. Após a neutralização em 0,4 M Tris, pH 7,5 e fixação no álcool etílico por 10 min, cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e analisados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Cem cometas em cada lâmina foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes, predefinidas no que diz respeito à intensidade da cauda, e a cada cometa foi dado um valor de 0, 1, 2, 3, ou 4 (de não danificado -0 - ao dano máximo - 4) (COLLINS et al., 1997). O escore foi obtido através do somatório das multiplicações do número de danos pelo valor do dano.

Biomarcadores Bioquímicos

Amostras de músculo e de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M) (pH 7,5), e centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4°C. As alíquotas destes sobrenadantes (fração S9) foram usados para análise da acetilcolinesterase muscular e cerebral. Amostras de fígado foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato (0,1M) (pH 6,5), e centrifugadas a 10.000xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante (S9) foi usado para análise de Peroxidação lipídica (LPO) e atividades da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e de Glutathione S-transferase (GST).

Atividade da acetilcolinesterase em cérebro e em músculo foi determinada usando a técnica colorimétrica descrita por ELLMAN et al. (1961) e adaptada para microplaca (SILVA DE ASSIS, 1998). Iodeto de acetiltiocolina (ATC) 9 mM foi usado como substrato e 5,5-

ditio-bis-2 nitrobenzoato (DTNB) 0,75 mM como reagente de cor. A densidade óptica a 405 nm foi medida usando um leitor de placas. Os resultados foram expressos em η mol de tiocolina formada/min/mg proteína.

A atividade da EROD foi medida com base no método de BURKE e MAYER (1974), com modificações por SILVA DE ASSIS (1998). A medida foi realizada com espectrofluorímetro com 530 e 590 nm como comprimentos de onda de excitação e de extinção, respectivamente. O princípio do método consiste na detecção fluorimétrica do produto final (resorufina), depois de uma reação de oxigênio-desetilação. Para padronização da metodologia de análise do CYP450 foi utilizado um grupo contaminado por via intracelomática com 30 mg/kg de β -naftoflavona em óleo de girassol, um potente indutor do CYP1A, gene responsável pelo metabolismo de xenobióticos em peixes (LANGE, 1996). Após 96 h os peixes foram sacrificados e os fígados retirados e conservados em freezer -70°C para posterior extração enzimática. Atividade enzimática foi calculada como pmol de resorufina formada/min/mg de proteína, usando uma curva padrão de resorufina.

Para medir a atividade da GST em fígado, a fração S9 foi obtida e a atividade global de GST foi medida em espectrofotômetro utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 3 mM e glutathiona reduzida (GSH) 3 mM como substratos (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976) em jundiás e para lambaris GSH 2 mM e CDNB 2,5 mM. Aumento de absorbância foi imediatamente medido a 340 nm por 2 minutos em intervalos de 12 segundos. A atividade da enzima foi calculada como η mol 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno conjugado formado/min/mg de proteína.

Para análise de LPO em fígado, amostras foram diluídas em metanol 90% e centrifugadas. O sobrenadante foi adicionado em microplacas, juntamente com a solução reação (0,1 mM laranja de xilenol, 25 mM ácido sulfúrico, 4,0 mM BHT butil hidroxitolueno e 0,25 mM sulfato ferroso amoniacal) e incubados por 30 min. Em seguida, as amostras foram lidas a 570 nm (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992) em espectrofotômetro e os níveis de LPO foram expressos em nmoles de hidroperóxidos /mg de proteínas.

A concentração de proteína através do método de BRADFORD (1976), em 595 nm, usando albumina bovina do soro (BSA) como padrão.

2.3 Análise estatística

Nos biomarcadores genéticos (testes de micronúcleo písceo e ensaios cometa com sangue), para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunns. Nos biomarcadores bioquímicos (AchE cerebral e

muscular, EROD, GST e LPO), análise de variância de uma via, seguida de Bonferroni, foi utilizada, para relação entre grupos controle e contaminados. Precedente às análises dos biomarcadores bioquímicos, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da amostra. A correlação entre atividade de AchE no músculo e peso e comprimento total dos peixes foi analisada pela correlação de Pearson. Os dados foram analisados por GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Todos os testes foram reconhecidos como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 *Rhamdia quelen*

Não foi observada mortalidade no decorrer do experimento. Os exemplares da espécie *Rhamdia quelen* ao final do bioensaio apresentavam-se dentro normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total. As médias das massas corpóreas foram 40,46 g no grupo controle; 40,72 g no grupo exposto à concentração 0,01 mg/l; 40,42 g no grupo exposto à concentração 0,03 mg/l e 40,62 no grupo exposto à concentração 0,1 mg/l. As médias dos comprimentos foram 18 cm no grupo controle e 17,96; 18,13 e 17,9 cm nos grupos expostos às concentrações 0,01; 0,03 e 0,1 mg/l, respectivamente.

No ensaio do micronúcleo písceo (micronúcleo somado às alterações morfológicas nucleares – Figura 01) em jundiás (*Rhamdia quelen*) a análise estatística mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e contaminados ($p=0,43$) (Figura 02).

No ensaio cometa com sangue dos jundiás não foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle e a concentração 0,01 mg/l ($p=0,44$) nem entre as concentrações 0,03 mg/l e 0,1 mg/l ($p=0,91$). Porém, foi observada diferença entre o controle e a concentração 0,03 mg/l ($p=0$); controle e concentração 0,1 mg/l ($p=0$); entre as concentrações 0,01 mg/l e 0,03 mg/l ($p=0$) e entre as concentrações 0,01 e 0,1 mg/l ($p=0$) (Figura 02b).

Em jundiás (*Rhamdia quelen*), quanto à análise da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, não houve diferença entre os grupos controle e expostos a nenhuma das concentrações. Assim como também não foi observada diferença entre as concentrações 0,03 mg/l e 0,1 mg/l. Porém, foi observada diferença significativa de atividade da enzima entre as concentrações 0,01 mg/l e 0,03 mg/l e entre 0,01 mg/l e 0,1 mg/l (Figura 03). A atividade (média \pm erro padrão da média) foi no grupo controle de $72,39 \pm 4,26 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$ e

nas concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l foram de: $52,56 \pm 5,73$; $79,10 \pm 4,84$ e $91,48 \pm 6,68$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Com relação à AchE muscular, foi observada diferença do grupo controle (média \pm erro padrão da média = $23,65 \pm 2,88$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$) em relação aos grupos expostos às concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l ($60,40 \pm 6,67$; $65,08 \pm 5,32$ e $61,10 \pm 5,36$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente) (Figura 03). Foi observado aumento na atividade da enzima nos grupos contaminados em comparação ao grupo controle, entretanto, não foi observada diferença entre as concentrações.

Não foi observada correlação da atividade da colinesterase no músculo nem com peso nem com comprimento total dos peixes.

Com relação à atividade da EROD, foi possível observar diferença entre o controle (média \pm erro padrão da média = $10,47 \pm 1,47$ $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$) e todas as concentrações utilizadas, porém, não foi observada diferença entre as concentrações. A atividade (média \pm erro padrão da média) nas concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l foi respectivamente $3,63 \pm 0,70$; $1,84 \pm 0,49$ e $1,29 \pm 0,26$ $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$. Nos grupos expostos ao nitrato de chumbo foi observada inibição acentuada da EROD em relação ao grupo controle (Figura 03).

Com relação à atividade da GST não houve diferença entre os grupos controle e expostos à contaminação, em nenhuma das concentrações. Assim como também não foi observada diferença entre as concentrações 0,03 mg/l e 0,1 mg/l. Porém, foi observada diferença significativa entre as concentrações 0,01 mg/l e 0,03 mg/l e entre 0,01 mg/l e 0,1 mg/l (Figura 03). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $41,10 \pm 2,88$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l foram $31,91 \pm 2,07$; $48,19 \pm 1,67$ e $45,67 \pm 2,67$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Na análise da LPO, foi somente observada diferença estatística entre o grupo controle e a concentração 0,01 mg/l e entre o grupo controle e a concentração 0,1 mg/l. Não foi observada diferença entre o grupo controle e a concentração 0,03 mg/l assim como também não foram observadas diferenças significativas entre as três concentrações testadas no bioensaio. Os níveis de peroxidação lipídica (média \pm erro padrão da média) foram $18,59 \pm 1,27$ $\text{nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo controle; $13,19 \pm 1,28$ $\text{nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo de contaminação 0,01 mg/l; $15,31 \pm 0,75$ $\text{nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo de contaminação 0,03 mg/l e $14,14 \pm 0,68$ $\text{nmoles.mg prot}^{-1}$ no grupo de contaminação 0,1 mg/l (Figura 03).

3.2 *Astyanax sp*

Foi observada mortalidade de dois exemplares durante o período de exposição, correspondente à 3,33% dos peixes utilizados, sendo que esta mortalidade foi observada no grupo exposto à concentração 0,1 mg/l. Os exemplares da espécie *Astyanax sp* ao final do bioensaio apresentavam-se dentro normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total. As médias das massas corpóreas foram 11,15 g no grupo controle; 8,6 g no grupo exposto à concentração 0,01 mg/l; 8,84 g no grupo exposto à concentração 0,03 mg/l e 8,81 no grupo exposto à concentração 0,1 mg/l. As médias dos comprimentos foram 10,83 cm no grupo controle e 9,72; 9,94 e 10,13 cm nos grupos expostos às concentrações 0,01; 0,03 e 0,1 mg/l, respectivamente.

A análise dos biomarcadores genéticos em lambaris (*Astyanax sp*) mostrou que no teste do micronúcleo písceo (micronúcleo somado às alterações morfológicas nucleares - Figura 04) somente foi observada diferença estatística significativa entre o controle e a maior concentração (0,10 mg/l; $p=0$). Não houve diferença entre o grupo controle e os grupos de concentrações 0,01 mg/l ($p=0,06$) e 0,03 mg/l ($p=0,25$); entre as concentrações 0,01 e 0,03 mg/l de nitrato de chumbo ($p=0,48$), entre as concentrações 0,01 e 0,10 mg/l ($p=0,35$) assim como também não houve diferença entre as concentrações 0,03 e 0,10 mg/l ($p=0,10$) (Figura 05a).

No ensaio cometa com sangue de lambaris foi observada diferença significativa nos escores de danos ao DNA entre os grupos controle e todas as concentrações: 0,01 mg/l ($p=0$), 0,03 mg/l ($p=0$) e 0,10 mg/l ($p=0$). Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações 0,01 mg/l e 0,03 mg/l ($p=0,31$), entre as concentrações 0,01 mg/l e 0,10 mg/l ($p=0,75$), nem entre as concentrações 0,03 mg/l e 0,10 mg/l ($p=0,48$) (Figura 05b).

Através da medição da atividade da acetilcolinesterase no cérebro foi somente observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo de concentração 0,03 mg/l de nitrato de chumbo. Não se observou diferença entre os demais grupos. A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $21,45 \pm 2,02$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l foram respectivamente $17,12 \pm 1,91$; $12,21 \pm 0,98$ e $17,41 \pm 1,60$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$ (Figura 06).

Entretanto, a análise da atividade da AchE no músculo mostrou diferença entre os grupos controle (média \pm erro padrão da média = $27,63 \pm 2,83$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$) e expostos as concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l foram $64,92 \pm 7,74$; $67,51 \pm 5,64$ e $50,73 \pm 5,44$ $\eta\text{mol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente (Figura 06). Foi observado aumento na atividade da enzima nos grupos expostos ao nitrato de chumbo, porém, não foram observadas

diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações utilizadas.

Foi observada correlação negativa da atividade da colinesterase em relação ao peso ($R^2=0,07$) e também em relação ao comprimento total dos peixes ($R^2=0,09$).

Com relação à atividade da EROD em *Astyanax sp*, não houve diferença entre os grupos. A atividade no grupo controle (média \pm erro padrão da média) foi $2,57 \pm 0,54$ pmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹ e nas concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l foram $1,982 \pm 0,39$; $3,30 \pm 0,74$ e $1,80 \pm 0,66$ pmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹, respectivamente (Figura 06).

Na análise da Glutathione S-Transferase foi observada diminuição significativa na atividade da GST nos animais expostos às concentrações de chumbo em relação ao grupo controle, porém não foi observada diferença entre as concentrações (Figura 06). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $17,83 \pm 0,85$ nmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹ e nas concentrações 0,01 mg/l; 0,03 mg/l e 0,1 mg/l foram $13,40 \pm 0,92$; $13,02 \pm 0,76$ e $12,07 \pm 1,21$ nmol.min⁻¹.mg prot.⁻¹, respectivamente.

Quanto aos níveis de peroxidação lipídica (LPO), não observada diferença significativa entre os grupos controle e expostos (Figura 06). Os níveis de peroxidação lipídica (média \pm erro padrão da média) foram $10,24 \pm 0,74$ nmoles.mg prot.⁻¹ no grupo controle; $9,11 \pm 0,89$ nmoles.mg prot.⁻¹ no grupo de exposição 0,01 mg/l; $7,14 \pm 0,93$ nmoles.mg prot.⁻¹ no grupo de exposição 0,03 mg/l e $6,99 \pm 0,72$ nmoles.mg prot.⁻¹ no grupo de exposição 0,1 mg/l.

4. Discussão

Metais são componentes naturais presentes nos ecossistemas. Eles são elementos importantes, indispensáveis para processos bioquímicos e fisiológicos nos seres vivos. Entretanto, muitos destes elementos, quando encontrados em altos níveis, podem ter efeitos adversos na saúde humana. Diversos metais com propriedades tóxicas e/ou genotóxicas, liberados na natureza de fontes domésticas ou industriais, são fatores de risco para o desenvolvimento de desordens neurodegenerativas, artrite e câncer (BARBOSA et al., 2010). A persistência ambiental dos metais, associados com seu uso intensivo nos últimos anos, tem produzido elevadas concentrações de metais na biosfera (KAKKAR; JAFFERY, 2005).

O chumbo, um metal muito tóxico, é amplamente usado em diversos processos industriais (JOHNSON, 1998) e pode ser responsável pela morte ou modificações subletais na reprodução, crescimento e comportamento de peixes (BURDENA; SANDHEINRICH; CALDWELL, 1998). Sua toxicidade é particularmente importante devido à sua persistência

no ambiente (OGUNSEITAN; YANG; ERICSON, 2000; GURER-ORHAN; SABÝR; ÖZGÜNES, 2004). Em condições normais, a concentração de chumbo encontrado em águas varia de 0,0006 - 0,12 mg/l (DEMAYO et al., 1982) embora concentrações tão elevadas como 0,89 mg/l já tenham sido relatadas (RTI, 1999). No Brasil, CASTRO et al. (1979) estudando uma represa, verificaram a presença dos metais pesados e 0,04 mg/l a concentração de chumbo observada na água. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estabelecia em 1976 como a concentração máxima permitida em água doce, para a sobrevivência de organismos aquáticos, 0,03 mg/l (EPA, 1976).

O chumbo entra no sistema aquático devido à erosão superficial do solo e deposição atmosférica. No Brasil, a concentração de chumbo em músculo de peixes coletados no ambiente excedeu o limite máximo permitido em peixes para consumo humano (2 µg Pb/g peixe, ANVISA, 2003) nas três espécies de peixe pesquisadas *Oligosarcus hepsetus*, *Geophagus brasiliensis* e *Hypostomus luetkeni* (TERRA et al., 2008).

Espécies de peixes podem ser consideradas como consumidores superiores em ecossistemas aquáticos. Como consequência, os micropoluentes presentes no ambiente aquático são prováveis de se acumularem, representando um risco potencial, não somente aos peixes, mas também às aves e mamíferos piscívoros, incluindo humanos. Monitoramento de espécies de peixes sentinela é amplamente utilizado para avaliar o grau de acumulação de poluentes e seus efeitos nos estados de saúde (BERVOETS et al., 2009). O uso de biomarcadores como respostas biológicas medidas em organismos afetados é muito importante para simplificar e diminuir os custos de biomonitoramentos, especialmente em ambientes aquáticos (BOMBAIL et al., 2001). Peixes são um dos organismos mais indicados para o monitoramento de ambientes aquáticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), entretanto, poucos são os estudos conduzidos com peixes de água doce da América do Sul (WILHELM FILHO et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; RABITTO et al., 2005; RAMSDORF et al., 2009a).

Em jundiás (*Rhamdia quelen*), no teste do micronúcleo písceo a análise estatística mostrou que não houve diferença entre os grupos controle e contaminados, enquanto que em lambaris (*Astyanax sp*) o teste do micronúcleo písceo mostrou diferença estatística significativa entre o controle e a dose 0,1 mg/l. No ensaio cometa com sangue em jundiás foi observada diferença entre o controle e as concentrações 0,03 mg/l e 0,1 mg/l e em lambaris foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle e expostos às três concentrações de chumbo, porém não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações.

RAMSDORF et al. (2009a) observaram diferença estatística entre grupos controle e contaminados com nitrato de chumbo somente no ensaio cometa com sangue, não tendo sido relatado aumento na frequência de micronúcleos nem de alterações morfológicas nucleares em traíras (*Hoplias malabaricus*) expostas à diferentes doses de chumbo por injeção intraperitoneal. Resultados negativos no teste do micronúcleo foram observados também com outros metais nas espécies de peixe *Salmo trutta* e *Phoxinus phoxinus* submetidos à injeção intraperitoneal com zinco e cobre (SANCHEZ-GALAN; LINDE; GARCIA-VAZQUEZ, 1999) com resultado semelhante observado em *Anguilla anguilla* (SANCHEZ-GALAN et al., 2001).

Em estudo realizado por ÇAVAS; GARANKO e ARKHIPCHUK (2005), exposições subcrônicas ao cromo hexavalente não induziu aumento na frequência dos micronúcleos em eritrócitos periféricos do sangue em três espécies de peixe. A presença de chumbo, níquel e de zinco, entre outros metais, na água, brânquias, músculo e fígado de duas outras espécies de peixe não foi seguida por alterações na frequência com micronúcleos em eritrócitos (KOCA et al., 2008). Estes efeitos podem ser devido à forte atividade tóxica que concentrações elevadas de metais pode exercer nas células dos peixes (ÇAVAS; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005). Em células humanas, POMA; PITTALUGA e TUCCI (2003) observaram indução de micronúcleos e troca de cromátides irmãs por acetato de chumbo de maneira dose-dependente.

Nossos resultados no teste do micronúcleo písceo indicam que a espécie *Astyanax sp* apresenta maior sensibilidade ao chumbo inorgânico que *Rhamdia quelen*, nas condições utilizadas no bioensaio. Este resultado é corroborado por PANTALEÃO et al. (2006), que destaca que algumas espécies de peixe são mais sensíveis que outras para análise da frequência dos micronúcleos. As diferenças na sensibilidade podem também ser em decorrência do tipo de célula analisada (ERGENE et al., 2007). Além disso, tem sido demonstrado que, em exposição prolongada a agentes químicos, a frequência dos micronúcleos nos eritrócitos mostrou-se diminuída após 15 e 21 dias de exposição (CAMPANA et al., 1999; De LEMOS et al., 2001). Estas diferenças parecem ser associadas à remoção da cinética celular (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2003) ou ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos de tolerância ao estresse causado pelos produtos químicos tóxicos que promovem um aumento na taxa da recolocação das células inoperantes ou danificadas para manter as condições fisiológicas normais (MERSCH; BEAUVAIS; NAGEL, 1996).

O ensaio cometa é uma ferramenta amplamente utilizada para detectar a genotoxicidade em ambientes aquáticos (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). De acordo

com KIM e HYUN (2006), o ensaio cometa é um biomarcador de genotoxicidade sensível e de confiança para monitoramento aquático, quando comparado ao teste do micronúcleo píceo.

Diversos estudos têm demonstrado que o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos ao DNA causados por uma variedade de contaminantes em peixes, atribuindo elevada sensibilidade ao teste (PANDRANGI et al., 1995; DEVAUX; PESONEN; MONOD, 1997). Nossos resultados corroboram esses estudos, pois observamos elevada sensibilidade do ensaio cometa nas duas espécies de peixes utilizadas. Em *Rhamdia quelen* foram detectados aumentos significativos nos escores de danos ao DNA nas concentrações 0,03 mg/l e 0,1 mg/l e em *Astyanax sp*, a contaminação foi evidenciada pelo ensaio cometa nas três concentrações de chumbo, inclusive na menor concentração testada (0,01 mg/l). GARCÍA-LESTÓN et al. (2010) em revisão sobre os efeitos genotóxicos do chumbo afirma que todos os estudos conduzidos em animais experimentais com o ensaio cometa mostraram um efeito positivo do chumbo na indução de danos ao DNA em diversos órgãos e tecidos e cita os trabalhos, em peixes, de FERRARO et al. (2004), OSMAN et al. (2008) e RAMSDORF et al. (2009a). AHMED et al. (2010) também verificaram efeito do cloreto de chumbo no DNA em vários tecidos de *Anabas testudineus* através do ensaio cometa.

O chumbo é conhecido por seus efeitos tóxicos na estrutura e função das membranas (DONALDSON; KNOWLES, 1993). Os efeitos nas membranas dos eritrócitos, em particular, têm sido intensivamente analisados, pois os eritrócitos têm elevada afinidade por chumbo, contêm a maioria do chumbo encontrado no sistema sangüíneo e são mais vulneráveis ao dano oxidativo que outras células (LEGGETT, 1993).

Quanto à análise da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, em jundiás (*Rhamdia quelen*), não foi observada diferença entre os grupos controle e expostos à contaminação, em nenhuma das concentrações. Com relação a AchE muscular, foi observada diferença entre o grupo controle e os grupos expostos às três concentrações de nitrato de chumbo, com aumento na atividade da enzima nos grupos contaminados em comparação ao grupo controle, entretanto, não foi observada diferença entre as concentrações.

Em *Astyanax sp*, a análise da atividade da AchE no cérebro mostrou somente diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo de concentração 0,03 mg/l de nitrato de chumbo, tendo sido observado nesse grupo, inibição da atividade da enzima no cérebro. A análise da atividade da AchE no músculo, em lambaris, mostrou diferença entre os grupos controle e contaminados com chumbo, com indução na atividade da enzima nos grupos expostos ao nitrato de chumbo, porém, não foram observadas diferenças significativas

entre as concentrações.

Atividades neurológicas e comportamentais de animais podem ser extremamente sensíveis a contaminação ambiental (BRETAUD; TOUTANT; SAGLIO, 2000). A atividade de colinesterase é considerada um marcador confiável de exposição a químicos anticolinérgicos, como pesticidas organofosforados e carbamatos (GALLOWAY et al., 2004). Entretanto, também existem evidências de que outras classes de químicos podem também afetar esse sistema de enzimas em peixes, como os metais (GILL; TEWARI; PANDE, 1990; ZINKL et al., 1991). *Hoplias malabaricus*, expostos ao chumbo inorgânico através da dieta (dose 21 µg Pb/g peso corpo), apresentou inibição da AchE em músculo após administração de 14 doses, além de diversos danos histopatológicos em fígado e rim (RABITTO et al., 2005).

Exposições de peixes a metais causam diferentes respostas na atividade da AchE como inibição (LIONETTO et al. 2003), aumento (ROMANI et al. 2003), ou nenhuma alteração (BEAUVAIS et al. 2001; SENGER et al. 2006).

No presente trabalho, nós verificamos a atividade da AchE no músculo induzida nos grupos contaminados com nitrato de chumbo, nas duas espécies e nas três concentrações estudadas. ROMANI et al. (2003) também observou aumento significativo na atividade da AchE no cérebro e no músculo de *Sparus auratus* expostos à concentração de 0,5 mg/l de cobre durante 20 dias. PRETTO et al. (2010) também observou aumento na atividade da AchE do músculo em *R. quelen* após exposição à concentração 0,414 mg/l de cádmio por 7 dias e ROSSI (2008) também observou atividade da AchE aumentada no músculo de lambaris expostos ao herbicida hexaron WG[®] por 96 horas. Neste trabalho, a autora relata que os lambaris do grupo que apresentou aumento da AchE também apresentaram natação descoordenada, movimentos operculares lentos e redução da locomoção. A AchE é responsável pela inativação da acetilcolina na fenda sináptica, e conseqüente extinção do estímulo, levando da mesma forma a uma diminuição do sistema colinérgico. Organismos possuem diversos potenciais de adaptação às modificações nas colinesterases, como aumento na síntese de colinesterases e decréscimo na síntese de acetilcolina.

Quanto à sensibilidade dos dois tecidos, nós observamos diferença entre os grupos controle e contaminados somente no tecido muscular, nas duas espécies de peixes utilizadas. Esses resultados concordam com FERRARI et al. (2004) e VENKATESWARA RAO (2006), que relataram maior sensibilidade do músculo que em cérebro de *Salmo trutta* e *Oreochromis mossambicus* expostos aos Azinfometil e à outro inseticida organofosforado (RPR-V). Adicionalmente, o tecido muscular oferece algumas vantagens sobre o cérebro, incluindo a

facilidade da coleta e da disponibilidade de uma quantidade maior de material (KIRBY et al., 2000).

Em *Astyanax sp.*, foi observada correlação negativa da atividade da AchE no músculo em relação ao peso ($R^2=0,07$) e em relação ao comprimento total dos peixes ($R^2=0,09$). STURM; SILVA DE ASSIS e HANSEN (1999) em *Gasterosteus aculeatus* e KLEMZ e SILVA DE ASSIS (2005) também observaram essa correlação em cascudos (*Ancistrus multispinnis*) contaminados com endossulfano. Nesse trabalho, os autores, citando SAWYER (1943; 1944) explicam que as correlações negativas encontradas podem ser devido ao fato de as colinesterases aparentemente serem formadas em taxas mais elevadas nas fases iniciais de desenvolvimento. Uma atividade máxima é atingida após um determinado período depois do qual a diminuição contínua da atividade enzimática passa a acompanhar, progressivamente, o aumento do tecido muscular.

Em relação à atividade da EROD, em *R. quelen*, foi observada diferença significativa entre o controle e as três concentrações de chumbo inorgânico utilizadas nesse trabalho, com inibição da EROD nos grupos expostos ao nitrato de chumbo. Em *Astyanax sp.*, entretanto, não foi observada diferença significativa entre os quatro grupos.

Diversos estudos têm mostrado um aumento na atividade da EROD em organismos expostos à xenobióticos em condições laboratoriais (revisão VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003) ou que habitam áreas contaminadas (VAN DER OOST et al., 1991; PLUTA, 1993; SHAHUNTHALA et al., 2004). Porém, existem também trabalhos que relatam diminuição da atividade da EROD frente à contaminação. Peixes expostos a organoestânicos, benzeno, cádmio e acrilamida apresentaram forte e significativa redução da atividade de EROD. Metais, como prata, cádmio e cobre, causam danos histológicos e são classicamente compostos que alteram a atividade da EROD (BUCHELI; FENT 1995; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O efeito inibitório na atividade da EROD pode ser explicado pela elevada concentração de xenobióticos. Estudos prévios demonstram que diversos indutores de CYP1A1 podem também inibir a atividade catalítica de enzimas como a EROD em altas concentrações (STEGEMAN; HAHN, 1994)

Com relação à atividade da GST de *R. quelen*, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e expostos ao nitrato de chumbo, em nenhuma das concentrações. Enquanto que em *Astyanax sp.* foi observada diminuição significativa na atividade dessa enzima nas três concentrações em relação ao grupo controle.

Aumento na atividade hepática da GST em peixes já foi relatado em vários estudos após a exposição a contaminantes, como fração solúvel do óleo diesel (SIMONATO; ALBINATI; MARTINEZ, 2006), sulfato de cobre (PARIS-PALACIOS; BIAGIANTI-RISBOURG; VERNET, 2000), dipirona (PAMPLONA et al., 2010), Rondup[®] (MODESTO; MARTINEZ, 2010); em exposição a sedimento coletado em locais poluídos (ALMEIDA; MELETTI; MARTINEZ, 2005) e em peixes de locais impactados (CAMARGO; MARTINEZ, 2006). Entretanto, existem relatos na literatura de redução da GST em peixes de locais poluídos e peixes expostos a PAHs, pesticidas e dioxinas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007), indicando que os resultados da GST devem ser analisados com cautela e associados com resultados de outros biomarcadores bioquímicos.

CORREA et al. (2008) ao realizarem bioensaios com *Rhamdia quelen* com tório (Th), verificaram que a atividade da GST nos tecidos muscular e hepático foi estimulada em baixas concentrações de Th porém em concentrações elevadas (608 µg/l) houve inibição da atividade da GST.

Estresse oxidativo tem sido associado com exposição à HPAs (STEPHENSEN et al., 2003; STURVE et al., 2006) e metais pesados (PARK et al., 2006; SRIVASTAVA; HARISH; SHIVANANDAPPA, 2006). A peroxidação de lipídeos é um marcador de efeito, que informa os danos causados aos lipídeos biológicos por espécies reativas de oxigênio (EROs), formadas naturalmente durante os processos metabólicos, mas também aumentadas após a exposição a xenobióticos (LIVINGSTONE, 2001; VALAVANIDIS et al., 2006). Lipoperoxidação ocorre quando danos causados por ROS não podem ser neutralizados pelas defesas naturais contra estresse oxidativo e é responsável pela desestabilização da membrana e das enzimas ligadas às membranas (PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

Deficiência no sistema antioxidante das células pode levar a um aumento na concentração de hidroperóxidos, promovendo a peroxidação de lipídeos (LPO) e causar dano celular com a geração de EROs (REGOLI et al., 2005). Em geral, organismos de ambientes poluídos mostram um aumento nos processos de LPO (FERREIRA; MORADAS-FERREIRA; REIS-HENRIQUES, 2005). Para CAMPANA; SARASQUETE e BLASCO (2003), o chumbo não é um bom indutor de peroxidação de lipídeos, entretanto, para PATRICK (2006) e SILBERGELD; WAALKES e RICE (2000), a geração de espécies reativas de oxigênio, estimulação de peroxidação de lipídeos e depleção de reservas antioxidantes têm sido postuladas como os maiores responsáveis pelas doenças relacionadas com exposição ao chumbo.

Em nosso trabalho, quanto à análise da LPO, em *R. quelen*, foi observada diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações 0,01 mg/l e 0,10 mg/l, tendo sido observada diminuição nos níveis de hidroperóxidos/mg de proteína nos grupos contaminados nas concentrações 0,01 mg/l e 0,10 mg/l. Em *Astyanax sp*, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e expostos. CORREA et al. (2008) também observaram redução na lipoperoxidação em *R. quelen* expostos ao tório.

O nitrato de chumbo, nas concentrações utilizadas nesse trabalho e através dos biomarcadores genéticos e bioquímicos utilizados, apresentou toxicidade para as espécies nativas. Em *R. quelen*, os biomarcadores que apresentaram resposta frente às concentrações de chumbo inorgânico foram ensaio cometa com sangue, AchE muscular, EROD e LPO e em *Astyanax sp* foram o teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa com sangue, AchE muscular e atividade de GST.

Quanto às concentrações testadas, a concentração 0,01 mg/l de nitrato de chumbo, a menor utilizada nesse trabalho, foi suficiente para aumentar a atividade de AchE muscular nas duas espécies, e em *R. quelen* provocou diminuição na atividade da EROD e diminuição da LPO e em *Astyanax sp*, danos ao DNA observados através do ensaio cometa em sangue e diminuição de GST. As concentrações 0,03 mg/l e 0,10 mg/l também provocaram danos ao DNA de *R. quelen* e a concentração 0,10 mg/l provocou aumento na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em *Astyanax sp*.

Desse modo, podemos concluir que nas concentrações testadas, o nitrato de chumbo apresentou toxicidade às espécies de peixes nativas *R. quelen* e *Astyanax sp*. Pela Resolução 357 (CONAMA, 2005), a concentração máxima de chumbo total permitida em águas de classes 1 e 2 é 0,01 mg/l, concentração essa capaz de provocar alterações bioquímicas e genéticas em espécies de peixes nativas.

5. Referências Bibliográficas

As referências citadas no capítulo III se encontram com as demais, no final da tese.

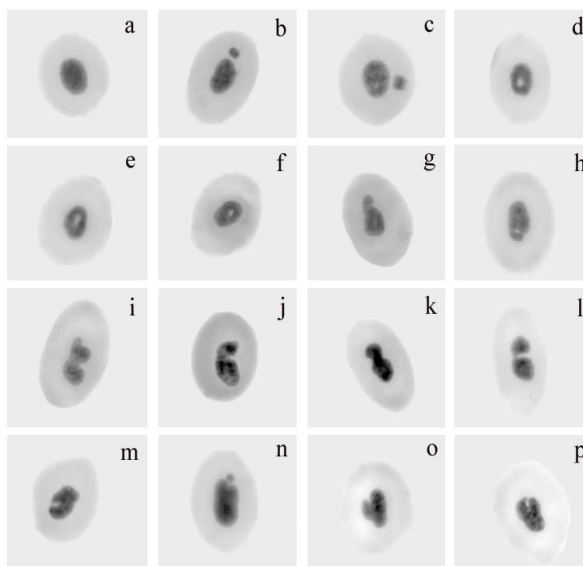


Figura 01 - Célula com núcleo normal (a), células micronucleadas (b; c) e células com alterações morfológicas nucleares (d-p) observadas nos exemplares de *Rhamdia quelen* expostos ao nitrato de chumbo, sendo d - f células com vacúolos. Aumento de 1.000x.

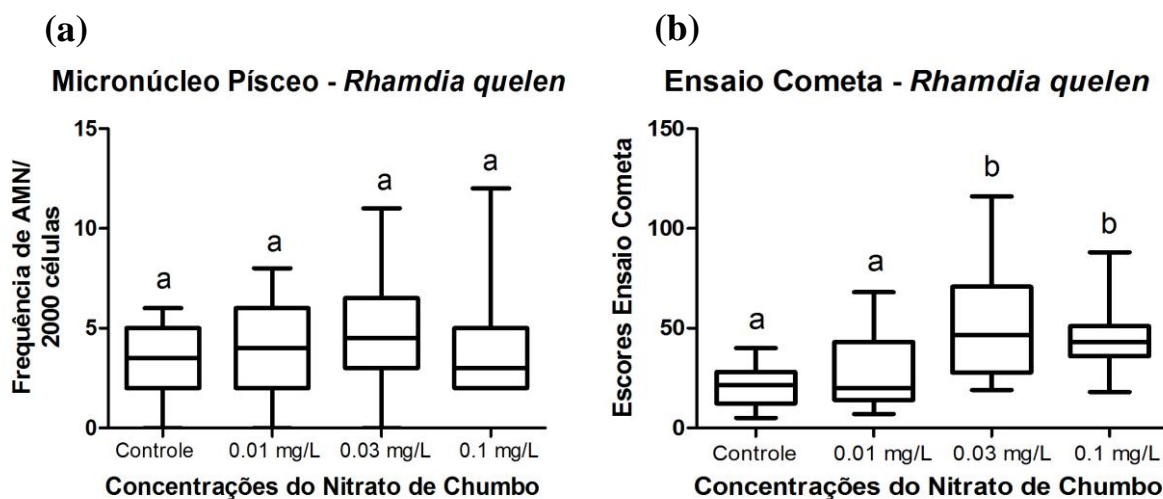


Figura 02 - Biomarcadores Genéticos em *R. quelen*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

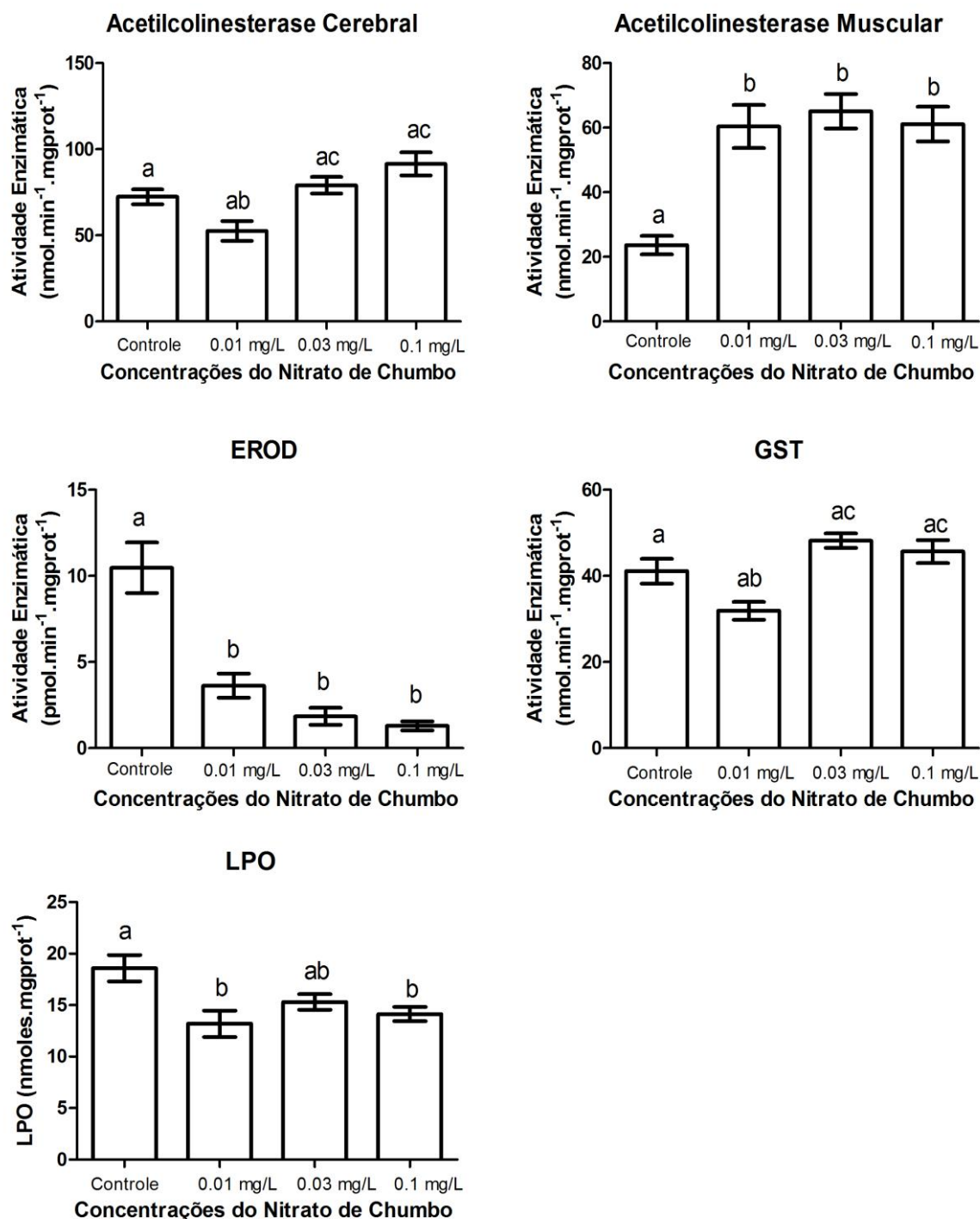


Figura 03 - Biomarcadores Bioquímicos em *R. quelen*. Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

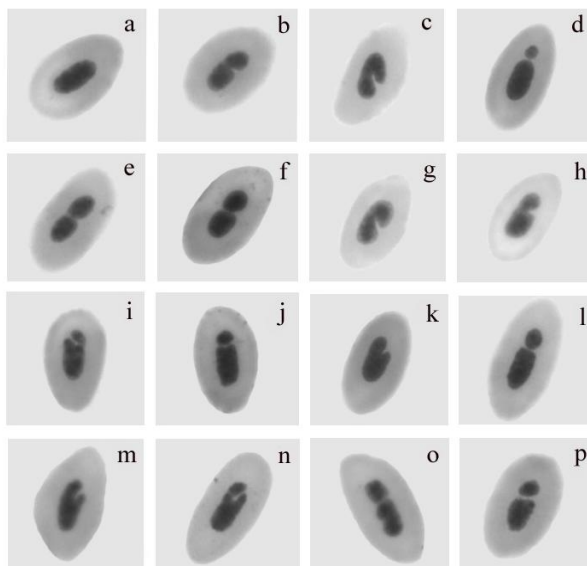


Figura 04 - Célula com núcleo normal (a) e células com alterações morfológicas nucleares (b-p) observadas nos exemplares de *Astyanax sp* expostos ao nitrato de chumbo. Aumento de 1.000x.

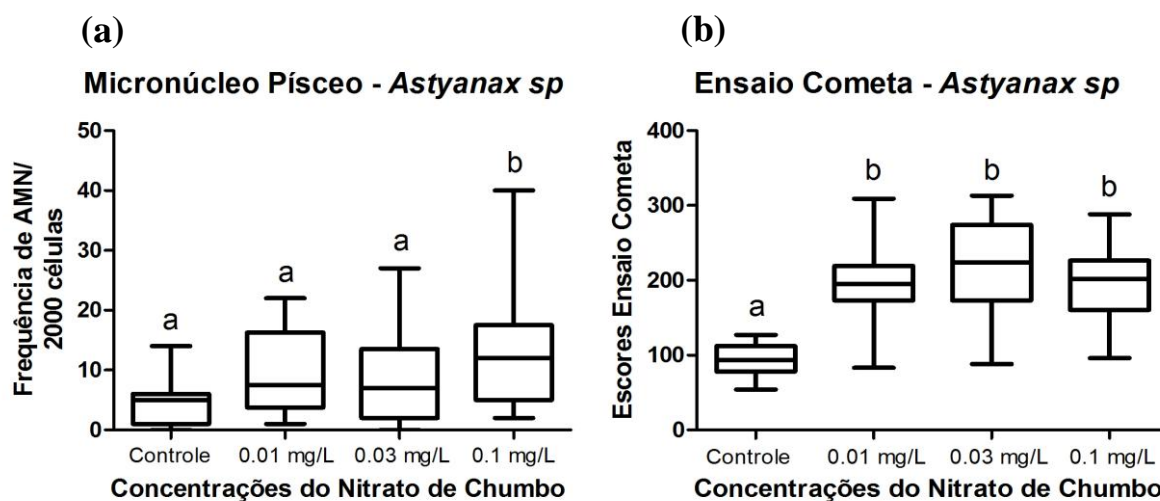


Figura 05 - Biomarcadores Genéticos em *Astyanax sp*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

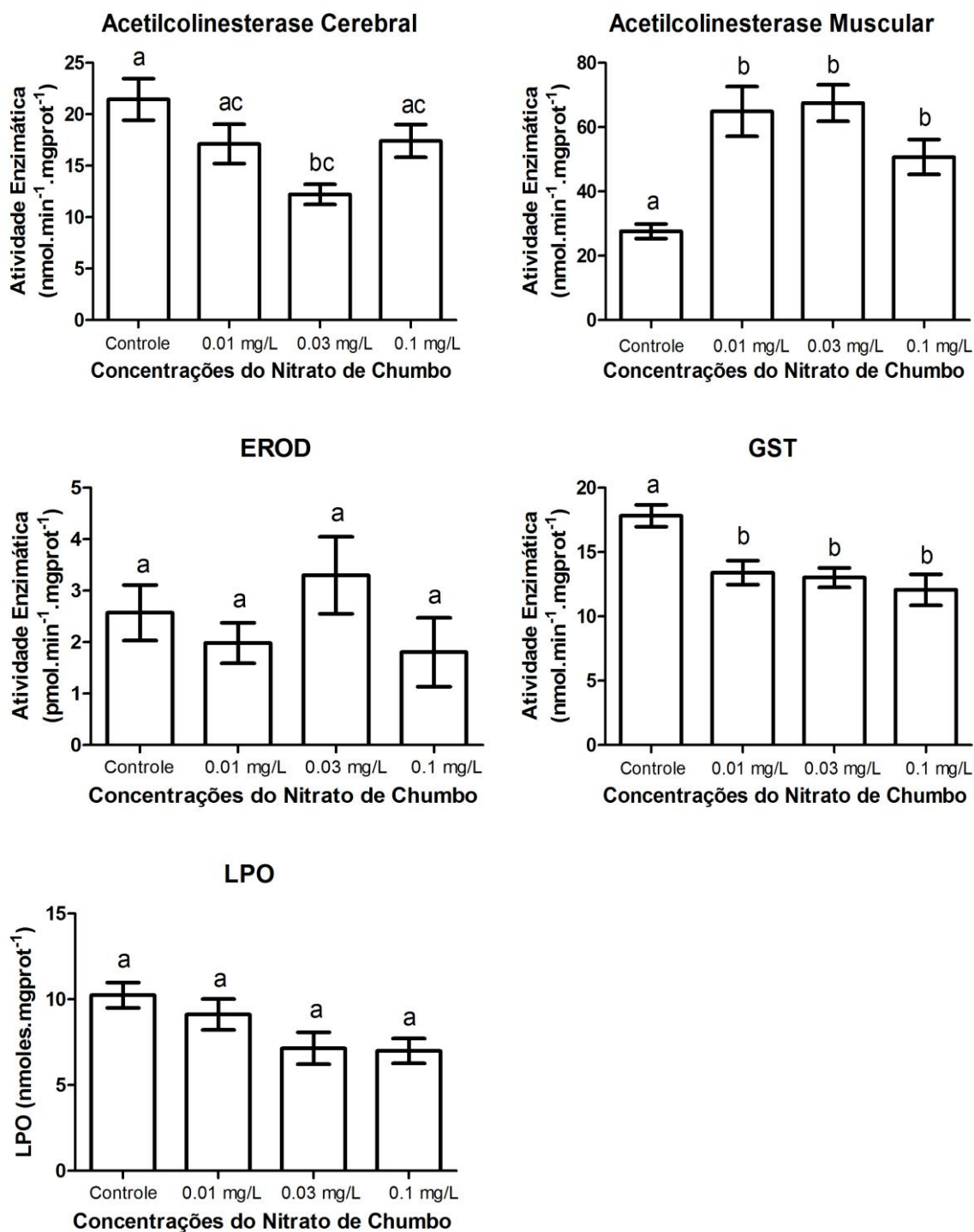


Figura 06 - Biomarcadores Bioquímicos em *Astyanax sp.* Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle e expostos às diferentes concentrações de nitrato de chumbo. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

CAPÍTULO IV

Avaliação da toxicidade subcrônica (28 dias) do naftaleno em *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp* utilizando biomarcadores genéticos e bioquímicos

Resumo

O naftaleno e seus derivados são os mais abundantes HPAs presentes em óleos crus. O objetivo do presente trabalho foi verificar a toxicidade subcrônica (28 dias) do naftaleno nas concentrações: 0,005; 0,06 e 3 mg/l. Os biomarcadores empregados foram o teste do micronúcleo píceo (frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares), danos ao DNA pelo ensaio cometa, AchE cerebral e muscular, GST, EROD e LPO, nas espécies de peixes endêmicas *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp.* Em *R. quelen*, nas concentrações testadas, houve aumento nos níveis de quebras no DNA e diminuição nos níveis de LPO. Na concentração 3 mg/l foi observada atividade aumentada de AchE cerebral e diminuída da AchE muscular. Em *Astyanax sp.*, as concentrações de naftaleno promoveram quebras no DNA e diminuição da AchE muscular. A concentração 3 mg/l aumentou atividade da EROD, da GST e dos níveis de LPO. Nossos resultados indicam elevado potencial tóxico do naftaleno em espécies de peixe endêmicas de água doce.

1. Introdução

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos aromáticos formados por dois ou mais anéis benzênicos e considerados poluentes orgânicos prioritários em estudos ambientais, tendo em vista que algumas dessas substâncias apresentam elevado potencial de toxicidade e são precursoras de efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007). Podem ser emitidos por fontes naturais, entretanto, fontes antropogênicas dominam a entrada de HPAs na natureza (WRIGHT; WELBOURN, 2002). Assim, maiores concentrações de HPAs são observadas próximo aos grandes centros urbanos.

Em geral, as populações dos peixes podem ser expostas no ecossistema aquático a uma concentração total do HPA variando de 50 a 410 mg/l (KAYAL; CONNEL, 1989; SMITH; BAGG; WRIGLEY, 1991). Estes compostos têm uma variedade de efeitos nocivos em organismos aquáticos, incluindo efeitos carcinogênicos, alterações dos sistemas endócrinos (GESTO et al., 2009), prejudicam processos de crescimento, reprodução e osmorregulação em peixes (NICOLAS, 1999), interferem na função da glândula endócrina (JOHNSON et al., 1998) e afetam processos de alocação de energia (ELUMALAI; BALASUBRAMANIAN, 1999). Acumulam-se rapidamente em organismos aquáticos e alcançam níveis maiores que os detectados no ambiente (PETERS et al., 1997).

Entre os HPAs que apresentam elevada toxicidade aguda estão naftaleno, antraceno, fluoreno, acenafteno, fenantreno, fluoranteno, pireno e criseno (CESTESB, 2008). O

naftaleno é um dos HPAs mais intensivamente estudado devido à sua alta toxicidade, baixa sensibilidade à fotoxidação, elevada persistência na água e baixo peso molecular (VIJAYAVEL et al., 2004). Em particular, o naftaleno e seus derivados como alquilnaftaleno, são os mais abundantes HPAs presentes em óleos crus (AAS et al., 2000) e freqüentemente encontrados em ambientes poluídos (LEE; ANDERSON, 2005).

Acredita-se que os naftalenos e fenantrenos sejam os principais responsáveis pela toxicidade aguda do óleo cru (ANDERSON et al., 1974 *apud* POLLINO; HOLDWAY, 2002). Óleos crus contêm aproximadamente 1,5% de HPAs, dos quais o naftaleno é o principal componente perfazendo 65% da constituição de HPAs totais (TRUSCOTT; IDLER; FLETCHER, 1992).

A exposição ao naftaleno induziu uma variedade de respostas, em nível celular e sistêmico em peixes teleósteos (NAVAS; SEGNER, 2000; TELES; PACHECO; SANTOS, 2003; THOMAS; BUDIANTARA, 1995). Em *Oncorhynchus mykiss*, exposição ao naftaleno provocou diminuição nos níveis de hormônios esteróides do plasma e afetou o metabolismo de energia em diversos órgãos, inclusive o cérebro, de maneiras dose e tempo dependentes (TINTOS et al., 2007).

O impacto do naftaleno em humanos e outros mamíferos têm sido estudados extensivamente (ORZALESI; MIGLIAVACCA; MIGLIOR, 1994). Entretanto, um número limitado de estudos tem sido conduzido para avaliar toxicidade do naftaleno em espécies aquáticas, notadamente peixes. A literatura recente da toxicidade do naftaleno em teleósteos abrange estudos de histopatologia (DI MICHELE; TAYLOR, 1978), fisiologia (KRAHM et al., 1984) e relações estrutura-toxicidade (BLACK et al., 1983). Mais recentemente, citotoxicidade (SCHIRMER et al., 1998), tempo de vida (GERT-JAN DE MAAGD et al., 1997) e respostas antioxidantes foram avaliadas. A genotoxicidade do naftaleno foi demonstrada em *Dicentrarchus labrax* (GRAVATO; SANTOS, 2002). Não obstante, considerando estudos em outras espécies, não em peixes, o potencial genotóxico do naftaleno parece ser de difícil consenso (PACHECO; SANTOS, 2002).

Biomonitores são organismos que mostram uma resposta integrada a fatores ambientais, que podem ser usados como um sistema complementar para monitorar os efeitos dos poluentes e fornecer indicadores reais da qualidade e da característica dos ambientes (BATZIAS; SIONTOROU, 2006). Peixes estão entre os organismos mais indicados para monitoramento da qualidade ambiental de ambientes aquáticos, pois ocupam diferentes níveis na cadeia trófica, sofrem bioacumulação, respondem aos agentes químicos em baixas concentrações e respondem como os mamíferos frente aos agentes tóxicos (GOKSOYR et

al., 1991). Entretanto, poucos estudos de toxicidade usando espécies de peixes de água doce nativas da América do Sul estão disponíveis (WILHELM FILHO et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; RABITTO et al., 2005; RAMSDORF et al., 2009a).

Rhamdia quelen, ou jundiá, pertence à família Heptapteridae (NELSON, 2006), é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, do sul do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma espécie endêmica brasileira promissora para o cultivo, pois apresenta rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo em criações intensivas, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES et al., 2000).

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto por Baird & Girard (1854) e a revisão mais recente cita 86 espécies (LIMA et al., 2003). Pertencente à família Characidae (FINK; FINK, 1981), popularmente conhecidos por lambaris, são utilizados para consumo humano, com médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho e grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Espécies do gênero *Astyanax* têm sido consideradas como zooplantívoras, insetívoras e onívoras, tendo papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas (SANTOS, 1981).

O objetivo desse trabalho foi verificar a toxicidade subcrônica (28 dias) do naftaleno nas espécies de peixes nativas *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp*, sob contaminação semi-estática por imersão, em três diferentes concentrações: 0,005 mg/l (limite estabelecido pela EPA em águas superficiais, IRWIN et al., 1997) e duas concentrações citadas na literatura, utilizadas em outras espécies de peixes: 0,06 mg/l (AAS et al., 2000) e 3 mg/l (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005), ambientalmente realísticas de locais pouco poluídos. Os biomarcadores empregados foram: genéticos (teste do Micronúcleo Písceo - Frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares e danos ao DNA pelo ensaio cometa alcalino do sangue) e bioquímicos (de neurotoxicidade: Acetilcolinesterase em cérebro e em músculo; de biotransformação: Glutathione *S*-transferase e Etoxiresorufina-*O*-deetilase; e de Estresse Oxidativo: Peroxidação lipídica), nas espécies de peixes nativas *Rhamdia quelen* (espécie de fundo) e *Astyanax sp* (espécie de coluna d'água).

2. Material e métodos

2.1 Exposição

Separadamente, exemplares de jundiás juvenis (*Rhamdia quelen*) (N=75) e de lambaris (*Astyanax sp*; N=75) foram adquiridos comercialmente e mantidos para aclimação

por 30 dias em tanque sob condições controladas (aeração constante, temperatura de 28°C, ciclos de 12 h claro/escuro, alimentação e limpeza da água a cada três dias). Posteriormente, os animais foram divididos em 5 aquários de 108 litros com 15 animais cada. Além dos 3 grupos expostos ao naftaleno e do controle negativo, devido à baixa solubilidade do naftaleno em água, esse foi dissolvido em etanol, e dessa forma, foi também criado um grupo de peixes com água com etanol (solvente para dissolver o naftaleno).

O naftaleno (CAS No. 91-20-3) foi dissolvido inicialmente em etanol e posteriormente na água em três concentrações: 0,005 mg/l, 0,06 mg/l e 3 mg/l. O método de exposição foi subcrônico (28 dias) e semi-estático (1/3 da água e do contaminante renovados a cada 72 horas). Essa exposição foi feita segundo SANTOS et al. (2006), com a quantidade de etanol sendo a mesma nos grupos de exposição (etanol e contaminados com naftaleno) para eliminar o possível efeito de quantidade diferenciada de álcool nos grupos expostos ao naftaleno.

Ao término do período de contaminação (28 dias), os peixes foram anestesiados (benzocaína 10%, Merck), pesados e medidos, e em seguida retirados: sangue (teste do micronúcleo písceo e ensaio cometa); fígado (atividades enzimáticas de EROD, GST e medição de LPO); cérebro e músculo (atividade da acetilcolinesterase, AchE).

O sangue para o ensaio cometa foi mantido em soro bovino fetal, refrigerado e na ausência de luz segundo RAMSDORF et al. (2009b). Os demais tecidos (fígado, cérebro e músculo) foram mantidos em gelo e posteriormente transferidos para freezer -70°C.

2.2 Metodologia

Biomarcadores Genéticos

O teste do micronúcleo písceo em hemácias periféricas foi realizado segundo a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975). Na análise, além da frequência de micronúcleos, também foram computadas as alterações morfológicas nucleares descritas por CARRASCO; TILBURY; MYERS (1990).

O ensaio cometa foi realizado com sangue periférico (eritrócitos) como descrito previamente por SPEIT e HARTMANN (1999). Resumidamente, 10 µl do sangue armazenado em 1 ml de soro bovino fetal foi diluído em 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e colocado em uma lâmina coberta por agarose normal. As lâminas foram mantidas em uma solução de lise (solução de lise estoque: NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8 %), N-lauril-sarcosinato (1%); solução de lise uso: triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque), por 24 h em 4°C, na ausência de luz. Na seguinte etapa, as lâminas foram primeiramente imersas em uma solução de NaOH (10 N) e

de EDTA (200 mM), pH 13 por 30 minutos, para efetuar a desnaturação do DNA, e submetido então à eletroforese a 300 mA, 25 V por 25 min. Após a neutralização em 0,4 M Tris, pH 7,5 e fixação no álcool etílico por 10 min, cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e analisados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Cem cometas em cada lâmina foram classificados visualmente como pertencendo a uma das cinco classes, predefinidas no que diz respeito à intensidade da cauda, e a cada cometa foi dado um valor de 0, 1, 2, 3, ou 4 (de não danificado (0) ao dano máximo (4)) (COLLINS et al., 1997). O escore foi obtido através do somatório das multiplicações do número de danos pelo valor do dano.

Biomarcadores Bioquímicos

Amostras de músculo e de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M) (pH 7,5), e centrifugadas a 10.000xg por 20 min a 4°C. As alíquotas destes sobrenadantes (fração S9) foram usados para análise da acetilcolinesterase muscular e cerebral. Amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato (0,1 M) (pH 6,5), e centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante (S9) foi usado para análise de Peroxidação lipídica (LPO) e atividades da Etoxiresorufina-*O*-deetilase (EROD) e de Glutathione *S*-transferase (GST).

Atividade da acetilcolinesterase em cérebro e em músculo foi determinada usando a técnica colorimétrica descrita por ELLMAN et al. (1961) e adaptada para microplaca (SILVA DE ASSIS, 1998). Iodeto de acetiltiocolina (ATC) 9 mM foi usado como substrato e 5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoato (DTNB) 0,75 mM como reagente de cor. A densidade óptica a 405 nm foi medida usando um leitor de placas. Os resultados foram expressos em nmol de tiocolina formada/min/mg proteína.

A atividade da EROD foi medida com base no método de BURKE e MAYER (1974), com modificações por SILVA DE ASSIS (1998). A medida foi realizada com espectrofluorímetro usando 530 e 590 nm como comprimentos de onda de excitação e de extinção, respectivamente. O princípio do método consiste na detecção fluorimétrica do produto final (resorufina), depois de uma reação de oxigênio-desetilação. Para padronização da metodologia de análise do CYP450 foi utilizado um grupo contaminado por via intracelomática com 30 mg/kg de β -naftoflavona em óleo de girassol, um potente indutor do CYP1A, gene responsável pelo metabolismo de xenobióticos em peixes (LANGE, 1996). Após 96 h os peixes foram sacrificados e os fígados retirados e conservados em freezer -70°C para posterior extração enzimática. Atividade enzimática foi calculada como pmol de resorufina formada/min/mg de proteína, usando uma curva padrão de resorufina.

Para medir a atividade da GST em fígado, a fração S9 foi obtida e a atividade global de GST foi medida em jundiás utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 3 mM e glutathiona reduzida (GSH) 3 mM como substratos (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976) e para lambaris GSH 2 mM e CDNB 2,5 mM em espectrofotômetro. Aumento de absorbância foi imediatamente medido a 340 nm por 2 minutos em intervalos de 12 segundos. A atividade da enzima foi calculada como ηmol 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno conjugado formado/min/mg de proteína.

Para análise de LPO em fígado, amostras foram diluídas em metanol 90% e centrifugadas. O sobrenadante foi adicionado em microplacas, juntamente com a solução reação (0,1 mM laranja de xilenol, 25 mM ácido sulfúrico, 4,0 mM BHT butil hidroxitolueno e 0,25 mM sulfato ferroso amoniacal) e incubados por 30 min. Em seguida, as amostras foram lidas em 570 nm (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992) em espectrofotômetro e os níveis de LPO foram expressos em nmoles de hidroperóxidos /mg de proteínas.

A concentração de proteína através do método de BRADFORD (1976), em 595 nm, usando albumina bovina do soro (BSA) como padrão.

2.3 Análise estatística

Nos biomarcadores genéticos (testes de micronúcleo písceo e ensaios cometa com sangue), para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunns. Nos biomarcadores bioquímicos (atividade de AchE no cérebro e no músculo, EROD, GST e LPO), análise de variância de uma via, seguida de Bonferroni, foi utilizada, para relação entre grupos controle e tratados. Precedente às análises dos biomarcadores bioquímicos, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da amostra. A correlação entre atividade de AchE no músculo e o comprimento total e peso dos peixes foi analisada pela correlação de Pearson. Os dados foram analisados por GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Todos os testes foram reconhecidos como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 *Rhamdia quelen*

Foi observada mortalidade de quatro exemplares durante o período de exposição, correspondente à 5,33% dos peixes utilizados, sendo que esta mortalidade foi observada nos grupos expostos ao etanol e exposto à concentração 3 mg/l (dois indivíduos em cada grupo).

Os exemplares da espécie *Rhamdia quelen* ao final do bioensaio apresentavam-se dentro normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total. As médias das massas corpóreas foram 21,97 g no grupo controle; 21,28 no grupo controle com etanol; 21,99 g no grupo exposto à concentração 0,005 mg/l; 21,02 g no grupo exposto à concentração 0,06 mg/l e 20,61 no grupo exposto à concentração 3 mg/l. As médias dos comprimentos foram 14,76 cm no grupo controle, 14,41 no grupo controle com etanol e 14,83; 14,63 e 14,5 cm nos grupos expostos às concentrações 0,005; 0,06 e 3 mg/l, respectivamente.

No ensaio do micronúcleo písceo (micronúcleo somado às alterações morfológicas nucleares – Figura 01) em jundiás (*Rhamdia quelen*) a análise estatística mostrou que não houve diferença entre o grupo controle e controle com etanol ($p=0,64$). Também não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo controle e contaminados com as concentrações de naftaleno de 0,005 mg/l ($p=0,37$) e 0,06 mg/l ($p=0,08$). Porém, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e exposto à maior concentração de naftaleno (3 mg/l; $p=0$). O mesmo ocorreu com o grupo controle com etanol, não sendo observada diferença entre este e as concentrações 0,005 mg/l ($p=0,69$) e 0,06 mg/l ($p=0,25$), mas com diferença entre este e o grupo de concentração 3 mg/l ($p=0,01$) (Figura 02a).

Não foram observadas diferenças entre as concentrações 0,005 mg/l e 0,06 mg/l ($p=0,43$); nem entre 0,06 mg/l e 3 mg/l ($p=0,16$), mas houve diferença estatisticamente significativa somente entre as concentrações 0,005 mg/l e 3 mg/l ($p=0,03$) (Figura 02a).

No ensaio cometa com sangue de *R. quelen* não foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle e controle com etanol ($p=0,07$); porém foi observada diferença entre os grupos controle e contaminados para as três concentrações (0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l; $p=0$).

Ao compararmos as três concentrações de naftaleno com o controle com etanol, não verificamos diferença estatisticamente significativa entre esses grupos ($p=0,29$ na comparação controle com etanol e concentração 0,005; $p=0,26$ na comparação controle com etanol e a concentração 0,06 mg/l e $p=0,42$ para controle com etanol e a concentração 3 mg/l).

Ao comparar as diferentes concentrações, também não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações ($p=0,93$ entre as concentrações 0,005 mg/l e 0,06 mg/l; $p=0,82$ entre as concentrações 0,005 mg/l e 3 mg/l e $p=0,77$ entre as concentrações 0,06 mg/l e 3 mg/l) (Figura 02b).

Quanto à análise da atividade da acetilcolinesterase no cérebro de *R. quelen* foi observado aumento significativo da atividade da enzima somente na comparação entre os

grupos com relação à concentração 3 mg/l. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle (média \pm erro padrão da média = $103,3 \pm 11,82$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$) e controle com etanol ($105,8 \pm 16,64$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$) nem mesmo entre os controles (negativo e controle com etanol) em comparação com as concentrações 0,005 mg/l e 0,06 mg/l. A atividade (média \pm erro padrão da média) nas concentrações 0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $135,6 \pm 10,63$; $119,5 \pm 9,62$ e $165,2 \pm 13,61$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente (Figura 03).

O mesmo resultado foi observado na atividade da AchE no músculo, somente sendo observada diferença significativa na comparação entre o grupo controle e o grupo exposto ao naftaleno na concentração 3 mg/l. Entretanto, de maneira inversa ao que ocorreu no cérebro, no tecido muscular foi observada inibição da enzima no grupo exposto à concentração 3 mg/l (Figura 03). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $191,0 \pm 10,89$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, controle com etanol $171,6 \pm 9,63$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $155,1 \pm 11,19$; $151,9 \pm 12,75$ e $116,6 \pm 14,05$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Foi observada correlação negativa entre pesos ($R^2=0,113$) e entre comprimentos total dos peixes ($R^2=0,113$) e a atividade da acetilcolinesterase no músculo.

Com relação à atividade da EROD, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 03). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $2,72 \pm 0,61$, controle com etanol $0,71 \pm 0,18$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $1,83 \pm 0,49$; $2,49 \pm 0,55$ e $2,07 \pm 0,31$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Na análise da Glutathione S-Transferase não foi observada diferença entre nenhum dos grupos estudados (Figura 03). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $28,26 \pm 1,24$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$; no grupo controle com etanol $29,85 \pm 0,99$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,005 mg/l, 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $29,97 \pm 1,45$; $30,83 \pm 1,19$ e $29,73 \pm 1,60$ $\eta\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Quanto à medição nos níveis de peroxidação lipídica (LPO), não foi observada diferença entre os grupos controle e controle com etanol. Entretanto, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle (negativo e controle com etanol) em relação aos grupos expostos às concentrações de naftaleno. Na comparação entre as concentrações, foi observada diferença entre 0,005 mg/l e 3 mg/l, o que não ocorreu entre as concentrações 0,005 mg/l e 0,06 mg/l e nem entre 0,06 e 3 mg/l de naftaleno (Figura 03). Nessa análise, observou-se um efeito dose-resposta, pois quanto maior a concentração do

naftaleno, menores os níveis de lipoperoxidação. Os valores (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $26,97 \pm 1,83$ nmoles.mg prot.⁻¹, no grupo controle com etanol $28,51 \pm 1,67$ nmoles.mg prot.⁻¹ e nas concentrações 0,005 mg/l, 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $17,37 \pm 1,39$; $14,93 \pm 2,41$ e $9,51 \pm 0,69$ nmoles.mg prot.⁻¹, respectivamente.

3.2 *Astyanax sp*

Foi observada mortalidade de sete exemplares durante o período de exposição, correspondente à 9,33% dos peixes utilizados, sendo que esta mortalidade foi observada nos grupos expostos ao etanol (mortalidade de 1 indivíduo) e expostos às concentrações 0,06 e 3 mg/l (mortalidade de 3 indivíduos de cada grupo). Os exemplares da espécie *Astyanax sp* ao final do bioensaio apresentavam-se dentro normalidade quanto às massas corpóreas e comprimento total. As médias das massas corpóreas foram 21,97 g no grupo controle; 21,28 no grupo controle com etanol; 21,99 g no grupo exposto à concentração 0,005 mg/l; 21,02 g no grupo exposto à concentração 0,06 mg/l e 20,61 no grupo exposto à concentração 3 mg/l. As médias dos comprimentos foram 14,76 cm no grupo controle, 14,41 no grupo controle com etanol e 14,83; 14,63 e 14,5 cm nos grupos expostos às concentrações 0,005; 0,06 e 3 mg/l, respectivamente.

A análise dos biomarcadores genéticos em lambaris (*Astyanax sp*) mostrou que no teste do micronúcleo písceo (micronúcleo somado às alterações morfológicas nucleares - Figura 04) não houve diferença entre o grupo controle e controle com etanol ($p=0,58$) e entre o controle e a concentração 0,06 mg/l ($p=0,25$). Porém, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos expostos às concentrações 0,005 mg/l ($p=0$) e 3 mg/l ($p=0,04$).

Em relação ao grupo controle com etanol, não observamos diferença entre esse e nenhuma das concentrações de naftaleno ($p=0,06$ entre controle com etanol e concentração 0,005 mg/l; $p=0,58$ entre controle com etanol e concentração 0,06 mg/l e $p=0,17$ entre controle com etanol e concentração 3 mg/l). Além disso, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações, a saber: $p=0,21$ entre 0,005 mg/l e 0,06 mg/l; $p=0,79$ entre 0,005 mg/l e 3 mg/l e $p=0,41$ entre 0,06 mg/l e 3 mg/l (Figura 05a).

No ensaio cometa com sangue de *Astyanax sp* não foi observada diferença significativa nos escores de danos entre os grupos controle e controle com etanol ($p=0,34$). Porém, observamos diferença entre o controle e as três concentrações de naftaleno ($p=0$ na comparação entre grupos controle e 0,005 mg/l e controle e 0,06 mg/l e $p=0,02$ na

comparação entre grupo controle e 3 mg/l). Ao compararmos o grupo controle com etanol e as diferentes concentrações, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,14$ na comparação entre os grupos controle com etanol e 0,005 mg/l; $p=0,09$ entre controle com etanol e 0,06 mg/l e $p=0,24$ entre controle com etanol e concentração 3 mg/l). Também não foi verificada diferença entre as concentrações ($p=0,74$ entre as concentrações 0,005 mg/l e 0,06 mg/l; $p=0,81$ entre 0,005 mg/l e 3 mg/l e $p=0,60$ entre as concentrações 0,06 mg/l e 3 mg/l) (Figura 05b).

Com relação à acetilcolinesterase cerebral em *Astyanax sp.*, não foi observada diferença entre os grupos, nem entre os controles (negativo e com etanol), nem entre estes e as diferentes concentrações de naftaleno testadas (Figura 06). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $40,69 \pm 3,29 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, controle com etanol $28,10 \pm 2,75 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $38,47 \pm 3,82$; $38,59 \pm 4,83$ e $43,43 \pm 1,77 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Na atividade da AchE no músculo não foi observada diferença significativa entre os controles (negativo e com etanol), porém foram observadas diferenças na comparação entre estes e as três concentrações de naftaleno testadas, tendo o xenobiótico diminuído significativamente a atividade da enzima na comparação com os grupos controles (negativo e controle com etanol). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as atividades nos grupos expostos ao naftaleno (Figura 06). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $43,49 \pm 4,61 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, no grupo controle com etanol $37,65 \pm 2,57 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ e nos grupos expostos às concentrações 0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $24,78 \pm 3,09$; $24,42 \pm 5,09$ e $25,41 \pm 3,14 \text{ } \eta\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente. Foi observada correlação negativa em relação à atividade da AchE muscular e o peso ($R^2=0,116$) e também com o comprimento total dos peixes ($R^2=0,139$).

Com relação à atividade da EROD, essa se apresentou aumentada de maneira significativa somente no grupo exposto à concentração 3 mg/l de naftaleno (Figura 06). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $4,45 \pm 0,57 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, controle com etanol $1,35 \pm 0,37 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,005 mg/l, 0,06 mg/l e 3 mg/l de naftaleno foram $1,72 \pm 0,33$; $0,85 \pm 0,44$ e $4,52 \pm 1,38 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Com relação à atividade da GST, não foi observada diferença significativa entre controle negativo e controle com etanol, nem entre estes e grupos expostos às concentrações de 0,005 mg/l e 0,06 mg/l de naftaleno. Somente foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos controles (negativo e com etanol) *versus* o grupos

exposto concentração 3 mg/l, com aumento da atividade da GST nessa concentração. Entretanto, não foram observadas diferenças entre as concentrações testadas (Figura 06). A atividade (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $16,97 \pm 1,46 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, controle com etanol $15,94 \pm 1,77 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$ e expostos às concentrações 0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $18,80 \pm 1,46$; $16,45 \pm 3,69$ e $25,98 \pm 3,01 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg prot.}^{-1}$, respectivamente.

Na análise da LPO, não foi observada diferença nos níveis de peroxidação lipídica entre o grupo controle e controle com etanol, nem entre estes controles e as concentrações 0,005 mg/l e 0,6 mg/l. Somente foi observada diferença na comparação entre esses quatro grupos *versus* o grupo exposto à concentração 3 mg/l de naftaleno. Nesse grupo, exposto à maior concentração de naftaleno, foi observado aumento significativo no níveis de peroxidação de lipídeos (Figura 06). O valor (média \pm erro padrão da média) no grupo controle foi $6,10 \pm 0,82 \text{ nmoles.mg prot.}^{-1}$, no grupo com etanol foi $3,64 \pm 0,64 \text{ nmoles.mg prot.}^{-1}$ e nas concentrações 0,005 mg/l; 0,06 mg/l e 3 mg/l foram $5,38 \pm 0,71$; $3,44 \pm 0,47$ e $10,56 \pm 1,19 \text{ nmoles.mg prot.}^{-1}$, respectivamente (Figura 06).

4. Discussão

A contaminação do ambiente aquático por hidrocarbonetos derivados de petróleo é freqüente e difundida. O óleo cru e seus produtos podem chegar ao ecossistema através de numerosas e diversas maneiras. Todos os componentes dos óleos, dos produtos refinados e dos resíduos de sua exploração têm um potencial inerente de impactar a saúde humana e ambiental (PEDROZO et al., 2002). Atualmente, os efeitos dos poluentes são de extremo interesse. Diversos estudos têm relatado a presença de compostos nocivos na plataforma continental. KLUMPP et al. (2002) encontrou níveis do HPA variando entre 3 e 61 $\mu\text{g/g}$ em águas na China. A maioria dos óleos apresenta uma composição básica de 15% a 40% de compostos aromáticos. O naftaleno corresponde a 85% dos HPAs totais detectados em amostras de óleo cru, entretanto, os efeitos tóxicos do naftaleno em peixes têm sido pouco estudados (TELES; PACHECO; SANTOS, 2003), e a maioria dos trabalhos que vêm sendo realizados, se restringem às espécies de peixes marinhos (SIMONATO, ALBINATI, MARTINEZ, 2006). Em peixes, a toxicidade do naftaleno varia muito entre espécies, sendo a CL 50 (24 h) 2,4 mg/l para *Cyprinodon variegatus*, CL 50 (96 h) 150 mg/l para *Gambusia affinis* e 0,92 mg/l (CL 50; 24 h) para *Oncorhynchus gorbuscha*. Já foi reportada a concentração média de naftaleno de 6,3 ng/l (0,0063 $\mu\text{g/l}$) em águas do Oceano Atlântico.

Amostras de águas subterrâneas de locais próximo ao tratamento/armazenamento de madeira no Canadá apresentaram concentrações de naftaleno entre 0,378 e 66 mg/l (IRWIN et al., 1997).

Como os ecossistemas aquáticos são os principais receptores de resíduos industriais e urbanos (HOFFMAN et al., 1995), um objetivo fundamental na ecotoxicologia é avaliar os riscos para os organismos aquáticos e as populações humanas (OLIVERIA RIBEIRO et al., 2006). Em ecotoxicologia, o uso de uma bateria de parâmetros celulares e bioquímicos para avaliar exposição/efeitos dos químicos é fortemente recomendado (CAJARAVILLE et al., 2000; VAN DER OOST, BEYER; VERMEULEN, 2003).

O teste do micronúcleo é um dos mais simples e rápidos testes para biomonitoramento da qualidade de águas doces (AL-SABTI; METCALFE, 1995; ERGENE et al., 2007). O teste do micronúcleo é amplamente empregado em peixes para investigar os efeitos genotóxicos de químicos, isolados ou em misturas, presentes no ambiente aquático (ver AL-SABTI; METCALFE, 1995; UDROIU, 2006 para revisão). Micronúcleos são pequenos, massa introcitoplasmática de cromatina resultante de quebras cromossômicas ou aneuploidias durante a divisão celular. O teste do micronúcleo representa uma importante ferramenta para o diagnóstico ambiental de áreas sobre influência humana, por detectar agentes mutagênicos (BELFIORE; ANDERSON, 2001). Dessa forma, em vertebrados aquáticos, esse teste tem sido amplamente usado para avaliar a influência da contaminação no ambiente aquático, especialmente em peixes (AL-SABTI; METCALFE, 1995; ERGENE et al., 2007).

O teste do micronúcleo písceo tem sido demonstrado como uma ferramenta eficiente, responsiva à exposição ao óleo cru, à diferentes HPAs (MARIA et al. 2002; GRAVATO; SANTOS, 2002; TELES; PACHECO; SANTOS, 2003; AL-SABTI; METCALFE, 1995; PACHECO; SANTOS, 1997), à derivados de petróleo (PACHECO; SANTOS, 2001), metais pesados (AL-SABTI; METCALFE, 1995), pesticidas (GRISOLIA, 2002) e à outros contaminantes (PACHECO; SANTOS, 1997; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000; 2001; GRAVATO; SANTOS, 2002).

HPAs têm sido considerados como causa de efeitos genotóxicos em peixes ou em células de peixes que foram detectados através do ensaio cometa (KAMMANN et al. 2001; AKCHA; HUBERT; PFHOL-LESZKOWICZ, 2003). Em acidentes com derramamento de óleo, FRENZILLI et al. (2004) mostrou elevado nível de dano ao DNA em *Zoarces viviparus* mesmo passado 3 semanas depois do acidente. KATSUMITI et al. (2009) também observou grande quantidade de danos ao DNA de peixes após acidente do Navio Vicuña na Baía de Paranaguá utilizando a espécie de bagre marinho *Cathorops spixii*.

No presente trabalho, no teste do micronúcleo písceo em jundiás (*Rhamdia quelen*), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e controle com etanol em relação ao grupo exposto à concentração 3 mg/l de naftaleno. No ensaio cometa com sangue foi observada diferença entre o grupo controle em relação aos grupos contaminados com o naftaleno nas três concentrações estudadas.

Em *Astyanax sp* o teste do micronúcleo písceo apresentou diferença entre o grupo controle e os grupos expostos às concentrações 0,005 mg/l e 3 mg/l. No ensaio cometa com sangue de lambaris, foi observada diferença entre os grupos controle e controle com etanol em relação aos grupos expostos às três concentrações de naftaleno.

Esses resultados indicam potencial mutagênico e genotóxico do naftaleno nas duas espécies de peixes estudadas, concordando com os resultados de GRAVATO; SANTOS (2002) em *Dicentrarchus labrax*, de DELGADO-RODRIGUEZ et al. (1995) em *Drosophila melanogaster* e de TELES; PACHECO; SANTOS (2003) em *Anguilla anguilla*. Entretanto, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados (EPA) e a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) classificam o naftaleno como não cancerígeno (IRWIN et al., 1997). O naftaleno, sendo um HPA planar, tem atividade genotóxica e carcinogênica devido ao seu mecanismo de ação no DNA como agente intercalante e sua capacidade de formar adutos (SAEED et al., 2009).

Em nosso estudo, o etanol foi usado como solvente nas exposições, e dessa forma um grupo controle com etanol foi necessário. No ensaio cometa de *R. quelen*, ao compararmos o grupo controle com etanol com os grupos exposto às três concentrações de naftaleno estudadas, não verificamos diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Em *Astyanax sp*, no teste do micronúcleo písceo não observamos diferença entre o grupo controle com etanol e os grupos expostos às diferentes concentrações do naftaleno e assim como também no ensaio cometa com sangue de lambaris não foi observada diferença entre o grupo controle com etanol e os grupos expostos às diferentes concentrações do naftaleno. Esses resultados indicam um possível efeito mutagênico ou genotóxico do etanol, nas duas espécies estudadas nesse trabalho.

SANTOS et al. (2006) também utilizaram um grupo com etanol para estudar os efeitos do naftaleno e observou que o etanol, assim como o naftaleno, foi responsável por alterar a taxa de excreção de amônia, como o naftaleno, em relação ao grupo controle negativo. Os autores relacionaram a baixa taxa de excreção de amônia com possíveis efeitos de estresse. OLIVEIRA-FILHO; GRISOLIA e PAUMGARTTEN (2009) verificaram efeito negativo do etanol na reprodução do molusco *Biomphalaria tenagophila*.

A geração de radicais livres é um importante passo no dano ao fígado provocado pelo etanol. Administração crônica ou aguda de etanol pode levar a aumento na peroxidação de lipídeos via produção exacerbada de EROs e/ou redução de antioxidantes como a vitamina E (JORDÃO JUNIOR et al., 2004). Em ratos, após administração aguda de etanol, foi observado aumento no dano ao DNA detectado através do ensaio cometa, além de diminuição dos níveis de antioxidantes e aumento de peroxidação de lipídeos, indicando a ocorrência de estresse oxidativo com possível dano ao material genético (JORDÃO JUNIOR et al., 2009). BLASIAK et al. (2000) verificou aumento nos danos no DNA em cultura de linfócitos humanos após administração do etanol.

Em *Rhamdia quelen* a análise da atividade da acetilcolinesterase no cérebro mostrou diferença significativa no grupo exposto ao naftaleno na concentração 3 mg/l, tendo sido observado, nessa concentração, aumento na atividade da AchE. Em *Astyanax sp*, não foi observada diferença entre os grupos com relação à atividade da AchE cerebral.

Com relação à atividade da AchE no músculo de *R. quelen*, somente foi observada diferença significativa na comparação dos grupos com a concentração 3 mg/l de naftaleno, com inibição da enzima nessa concentração. Em *Astyanax sp*, quanto à atividade da AchE muscular, foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos controle e controle com etanol em relação às três concentrações testadas, também com diminuição da atividade da enzima nos grupos expostos ao naftaleno.

Nossos resultados indicam maior sensibilidade da AchE muscular que cerebral em *Astyanax sp*, tendo em vista que nessa espécie a AchE muscular respondeu às três concentrações de naftaleno e a AchE cerebral não respondeu à exposição ao xenobiótico. Através da análise da AchE muscular, também podemos sugerir uma possível maior sensibilidade da espécie *Astyanax sp* em relação à *R. quelen*, tendo em vista que *R. quelen* respondeu somente à concentração 3 mg/l e *Astyanax sp* respondeu às três concentrações.

A atividade da AchE pode diferir dependendo do tecido ou do órgão que está sendo analisado e a classe de composto químico estudado (FULTON; KEY, 2001). A inibição da colinesterase muscular causa uma super estimulação das fibras musculares, que pode levar ao tétano, paralisia ou morte (KIRBY et al., 2000). Entretanto, a colinesterase cerebral tem sido melhor estudada que a muscular em peixes (GRUE; HART; MINEAU, 1991).

Em *Salmo trutta*, a colinesterase muscular mostrou menor sensibilidade e maior inativação da capacidade de recuperação do que a colinesterase do cérebro, após a exposição a uma concentração subletal de Azinfo Metil (FERRARI et al., 2004). Similarmente, VENKATESWARA RAO (2006) relatou menor recuperação da atividade de colinesterase no

músculo na comparação com o cérebro após exposição subletal à outro inseticida organofosforado (RPR-V) no peixe *Oreochromis mossambicus*. Uma taxa de recuperação diferente pode estar associada a uma taxa diferente de síntese da proteína nos órgãos ou ser relativa às associações de colinesterases e aos aspectos toxicodinâmicos. A falta da recuperação da atividade da colinesterase muscular após a exposição subletal ao Azinfo Metil reforça sua utilidade como um biomarcador de exposição à organofosforados. Adicionalmente, o tecido muscular oferece algumas vantagens sobre o cérebro, incluindo a facilidade da coleta e da disponibilidade de uma quantidade maior de material (KIRBY et al., 2000).

Atividade de colinesterase é considerada um marcador confiável de exposição a químicos anticolinérgicos, como pesticidas organofosforados e carbamatos (GALLOWAY et al., 2004). Entretanto, estão aumentando as evidências de que outras classes de químicos podem também afetar esse sistema de enzimas em peixes como compostos petroquímicos incluindo HPAs (VIEIRA et al., 2008), bifenilas policloradas (BUET et al., 2006), detergentes (JIFA et al., 2005; FENG et al., 2008), metais (GILL; TEWARI; PANDE, 1990; ZINKL et al., 1991) e misturas complexas de poluentes (PAYNE et al., 1996).

Os resultados obtidos por KATSUMITI et al. (2009) indicaram aumento na atividade da colinesterase no local referência, após o derramamento de óleo pelo navio Vicuña (Paranaguá, Brasil), um resultado que é difícil de associar com a poluição crônica da área, ou com o derramamento de óleo, especificamente. Assim, os autores observam que este biomarcador aparentemente não é ideal para uma avaliação aguda dos efeitos de um derramamento de óleo em espécie demersal de peixe.

Em *R. quelen* foi observada correlação negativa entre a atividade da AchE no músculo e peso ($R^2=0,113$) e comprimento total dos peixes ($R^2=0,113$). O mesmo foi observado em *Astyanax sp* ($R^2=0,116$ entre peso e AchE no músculo e $R^2=0,139$ entre comprimento total e AchE muscular). STURM; SILVA DE ASSIS; HANSEN (1999) em *Gasterosteus aculeatus* e KLEMZ e SILVA DE ASSIS (2005) em cascudos (*Ancistrus multispinnis*) contaminados com endossulfano também observaram correlação negativa. Nesse trabalho, os autores, citando SAWYER (1943; 1944) explicam que as correlações negativas encontradas podem ser devido ao fato de as colinesterases serem formadas aparentemente em taxas mais elevadas nas fases iniciais de desenvolvimento. Uma atividade máxima é atingida após um determinado período depois do qual a diminuição contínua da atividade enzimática passa a acompanhar, progressivamente, o aumento do tecido muscular.

O fígado é um importante tecido tendo em vista que os impactos causados pelos

poluentes ambientais nos processos bioquímicos e celulares podem vir a afetar a fisiologia, comportamento, reprodução e sobrevivência dos peixes (LAM; GRAY, 2003; VASSEUR; COSSU-LEGUILLE, 2003; EGGEN et al., 2004; MOORE et al., 2004).

Em *Rhamdia quelen*, em relação à atividade da EROD no fígado, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém em *Astyanax sp*, houve aumento da atividade da enzima no grupo exposto à concentração 3 mg/l de naftaleno.

É bem conhecido que xenobióticos classificados como compostos HPAs induzem reações dependentes do citocromo P450 microsomal em peixes (FOUCHÉCOURT et al., 1999). Diversos estudos têm mostrado aumento na atividade da EROD em organismos que habitam áreas contaminadas por HPAs (VAN DER OOST et al., 1991; PLUTA, 1993; SHAHUNTHALA et al., 2004). Em um biomonitoramento próximo ao Rio Douro (Portugal), área influenciada por diversos poluentes incluindo HPAs, utilizando a espécie *Mugil cephalus*, foi observada indução da atividade da EROD e de outros biomarcadores bioquímicos, como a GST (FERREIRA; MORADAS-FERREIRA; REIS-HENRIQUE, 2005).

Biomarcadores também têm sido empregados em espécies de peixes sentinelas após acidentes de derramamento de óleo. Após um derramamento de óleo na costa da Escócia, em 1993, foi observada elevada atividade da EROD (GEORGE; WRIGHT; CONROY, 1995). Duas semanas e três meses após derramamento de óleo da Empress Sea que afetou South West Wales em 1996, a atividade de EROD em peixes (KIRBY; NEALL; TYLOR, 1999), e os níveis de adutos de DNA em peixes e mexilhões (LYONS; HARVEY; PARRY, 1997, HARVEY et al., 1999) podiam discriminar entre áreas diretamente poluídas pelo derramamento e locais não poluídos. Em *Oncorhynchus mykiss*, na Itália, a influência do altamente poluído Rio Lambro sobre o Rio Po, foi demonstrada através do aumento da atividade da EROD após o tributário, bem como aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos em experimento laboratorial com a água do rio Po antes e após o tributário (De FLORA et al., 1993).

Em condições laboratoriais, aumento da atividade da EROD também foi observado em *O. mykiss* expostos à água fornecida aos aquários através de uma mangueira de borracha. Nesse trabalho, dois aditivos da borracha foram identificados nas amostras de água, o 2-mercaptobenzotiazol e a difenilamina, HPAs hidroxilados (STEPHENSEN et al, 2005). SILVA DE ASSIS et al. (2009) verificou aumento da atividade da EROD em *Ancistrus multispinis* contaminados com o inseticida deltametrina.

Em exposições laboratoriais de *Dicentrarchus labrax* L. ao naftaleno, concentrações

variando de 0 a 2.7 μM por algumas horas (0, 2, 4, 6 e 8 h), GRAVATO e SANTOS (2002) observaram aumento da atividade da EROD no fígado entre 0 e 6 h de exposição em todas as concentrações de naftaleno, seguido por um decréscimo entre 6 e 8 h. AAS et al., (2000) trabalhando com *Gadus morhua*, expostos à concentração 1 mg/l de naftaleno, observou aumento significativo da atividade da EROD associado com formação de adutos no DNA e na concentração 0,06 mg/l, foi observada indução da EROD em 16 dias de experimento mas não em 30 dias.

Na análise da Glutathione S-Transferase em *Rhamdia quelen* não foi observada diferença entre os grupos. Entretanto, em *Astyanax sp.*, foi observada diferença significativa na comparação entre os grupos controle e controle com etanol em relação ao grupo exposto à concentração 3 mg/l de naftaleno, com aumento da atividade da GST nessa concentração.

Aumento na atividade hepática da GST em peixes já foi relatado em vários estudos após a exposição a contaminantes, como fração solúvel do óleo diesel (SIMONATO; ALBINATI; MARTINEZ, 2006), dipirona (PAMPLONA et al., 2010), Rondup® (MODESTO; MARTINEZ, 2010); em exposição a sedimento coletado em locais poluídos (ALMEIDA; MELETTI; MARTINEZ, 2005) e em peixes de locais impactados (CAMARGO; MARTINEZ, 2006). Elevada atividade de GST foi também reportada por BEYER et al. (1996) e STIEN et al. (1998) em peixes capturados em locais poluídos. Estes autores sugerem que a enzima foi induzida por contaminantes orgânicos, como o petróleo.

A exposição de *Carassius auratus* à fração solúvel em água de óleo diesel resultou em aumento na atividade da GST (ZHANG et al., 2004) e o aumento na atividade GST também foi observada por SILVA et al. (2009), utilizando a espécie *Astyanax sp.* exposta em água de região afetada por derramamento de petróleo. Exposição de *Oreochromis mossambicus* à HPAs mostrou uma indução da atividade de GST em elevadas concentrações de HPAs, enquanto que em baixas concentrações, uma inadequada conjugação com metabólitos reativos foi observada, causando danos aos tecidos (SHAILAJA; D'SILVA, 2003).

TELES; SANTOS; PACHECO (2003) relataram aumento significativo na atividade de GST somente a 2 e 48 h de exposição a 0,9 μM de naftaleno, porém verificaram que essa concentração induziu um geral aumento na GST durante todo o experimento. Nossos resultados, em exposição subcrônica ao naftaleno, mostraram apenas indução da GST pelo naftaleno na concentração 3 mg/l em *Astyanax sp.*

O aumento da atividade da GST tem sido associado com uma adaptação defensiva do organismo contra uma variedade de compostos orgânicos presentes no ambiente (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Estresse oxidativo tem sido associado com exposição à HPAs (STEPHENSEN et al., 2003; STURVE et al., 2006) e metais pesados (PARK et al., 2006; SRIVASTAVA; HARISH; SHIVANANDAPPA, 2006.). Deficiência no sistema antioxidante das células pode levar a um aumento na concentração de hidroperóxidos, promovendo a peroxidação de lipídeos (LPO) e causar dano celular com a geração de EROs (REGOLI et al., 2005).

Quanto à medição nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) em *R. quelen* foi observada diferença entre os controles (negativo e com etanol) em relação às concentrações de naftaleno. Ao compararmos as diferentes concentrações, observamos diferenças entre as concentrações 0,005 mg/l e 3 mg/l, não sendo observada diferença entre as concentrações 0,005 mg/l e 0,06 mg/l; nem diferença significativa entre as concentrações 0,06 mg/l e 3 mg/l. Nessa análise, observou-se um efeito dose-resposta, pois quanto maior a concentração do naftaleno, menores os níveis de lipoperoxidação nesta espécie.

Em *Astyanax sp.*, na análise da LPO foi somente observada diferença na comparação entre os grupos controle, controle com etanol, concentrações 0,005 mg/l e 0,06 mg/l em relação ao grupo exposto à concentração 3 mg/l. Nesse grupo, exposto à maior concentração de naftaleno, foi observado aumento significativo no níveis de peroxidação de lipídeos. SCHIRMER et al. (1998) em célula branquial de *Oncorhynchus mykiss*, comprovaram que HPAs com dois ou três anéis benzênicos conjugados causam efeito citotóxico, especialmente devido à perturbação geral na membrana da célula.

A peroxidação de lipídeos é um marcador de efeito, que informa os danos causados aos lipídeos biológicos por EROs formadas naturalmente durante os processos metabólicos, mas também aumentadas após a exposição à xenobióticos (LIVINGSTONE, 2001; VALAVANIDIS et al., 2006). LPO ocorre quando danos causados por EROs não podem ser neutralizados pelas defesas naturais contra estresse oxidativo e é responsável pela desestabilização da membrana e das enzimas ligadas às membranas (PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

Hidrocarbonetos aromáticos halogenados e HPAs são xenobióticos capazes de gerar metabólitos mutagênicos, quebras no DNA, EROs e estresse oxidativo. Em geral, organismos de ambientes poluídos mostram um aumento nos processos de LPO (FERREIRA; MORADAS-FERREIRA; REIS-HENRIQUES, 2005). O DNA no núcleo da célula é outro componente celular-chave particularmente susceptível aos danos oxidativos ocasionados por espécies reativas de oxigênio (CERUTTI, 1985).

Muitos estudos têm demonstrado aumento da peroxidação lipídica em vários tecidos de peixes expostos a diversos tipos de contaminantes. Exemplos incluem carpas expostas ao

defensivo agrícola Paraquat e bagres expostos a sedimento contaminado com HPA, dentre outros (STEGEMAN et al., 1992). Assim, a peroxidação lipídica tem potencial para ser utilizada como biomarcador.

O naftaleno, nas concentrações testadas nesse trabalho e através dos biomarcadores genéticos e bioquímicos utilizados, apresentou toxicidade para as espécies nativas. Em *R. quelen*, os biomarcadores que apresentaram resposta frente às concentrações do naftaleno foram micronúcleo pístico, ensaio cometa com sangue, AchE cerebral e muscular e LPO. Em *Astyanax sp*, com exceção da AchE cerebral, todos os biomarcadores utilizados (teste do micronúcleo pístico, ensaio cometa com sangue, atividades da AchE muscular, da EROD e da GST e medição dos níveis de LPO) foram sensíveis à contaminação do naftaleno.

Quanto às concentrações testadas, a concentração 0,005 mg/l de naftaleno, a menor utilizada nesse trabalho, foi suficiente para induzir quebras no DNA das duas espécies estudadas, e em *R. quelen* provocou diminuição nos níveis de peroxidação lipídica. Em lambaris, *Astyanax sp*, além de aumentar os níveis de danos ao DNA observados através do ensaio cometa em sangue, o naftaleno também foi responsável pela inibição da AchE no músculo.

A concentração 3 mg/l, a mais alta utilizada em nosso trabalho, induziu aumento na frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares, aumento significativo na atividade da AchE cerebral e diminuição da AchE muscular em *R. quelen*. Em *Astyanax sp*, induziu aumento na frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares, aumento na atividade das enzimas de biotransformação (EROD e GST) e aumento nos níveis de lipoperoxidação, além de diminuição da AchE muscular, que já havia sido observada na concentração 0,005 mg/l.

Desse modo, podemos concluir que nas concentrações testadas, o naftaleno apresentou toxicidade às espécies de peixes nativas *R. quelen* e *Astyanax sp*, toxicidade essa detectada através dos biomarcadores genéticos e bioquímicos. Também podemos destacar que a espécie *Astyanax sp* se mostrou mais susceptível ao xenobiótico naftaleno que *R. quelen* em quase todas os biomarcadores, indicando que *Astyanax sp* pode ser mais sensível a menores concentrações do naftaleno do que a espécie *R. quelen*.

5. Referências Bibliográficas

As referências citadas no capítulo IV se encontram com as demais, no final da tese.

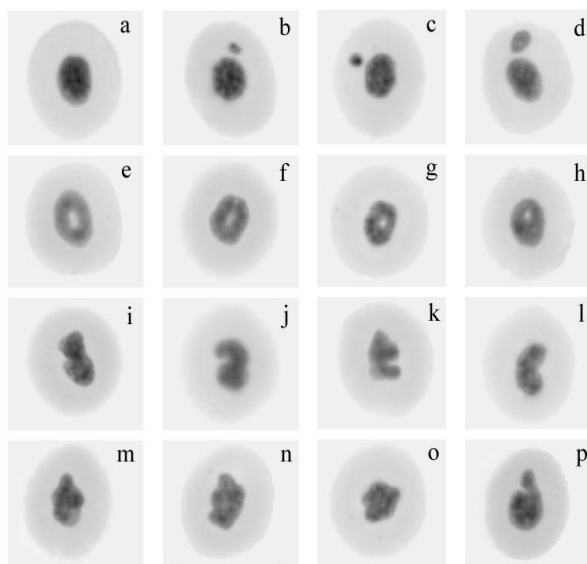


Figura 01 - Célula com núcleo normal (a), células micronucleadas (b-d) e células com alterações morfológicas nucleares (e-p) observadas nos exemplares de *Rhamdia quelen* expostos ao naftaleno, sendo apresentado em e-h núcleos com vacúolos. Aumento de 1.000x.

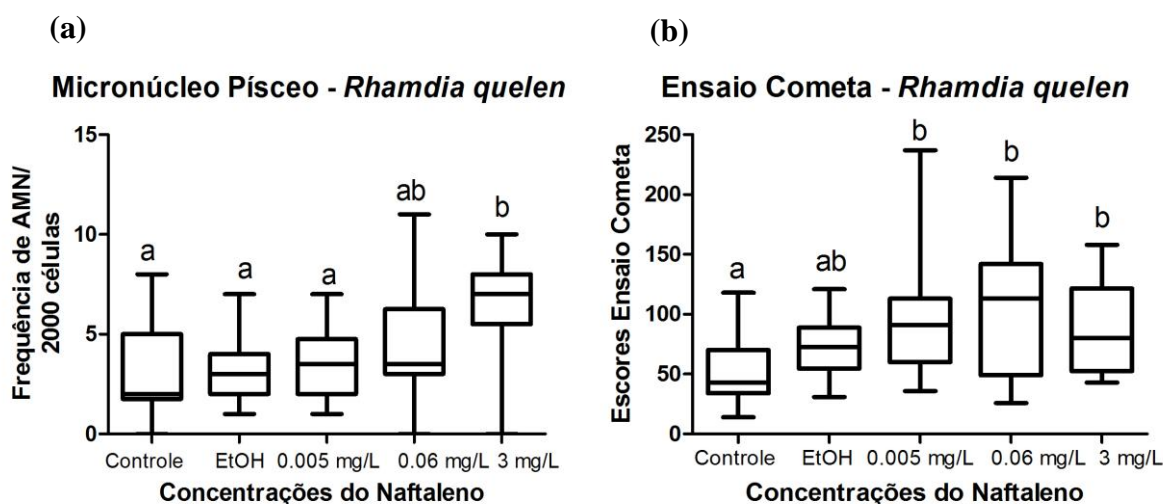


Figura 02 - Biomarcadores Genéticos em *R. quelen*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

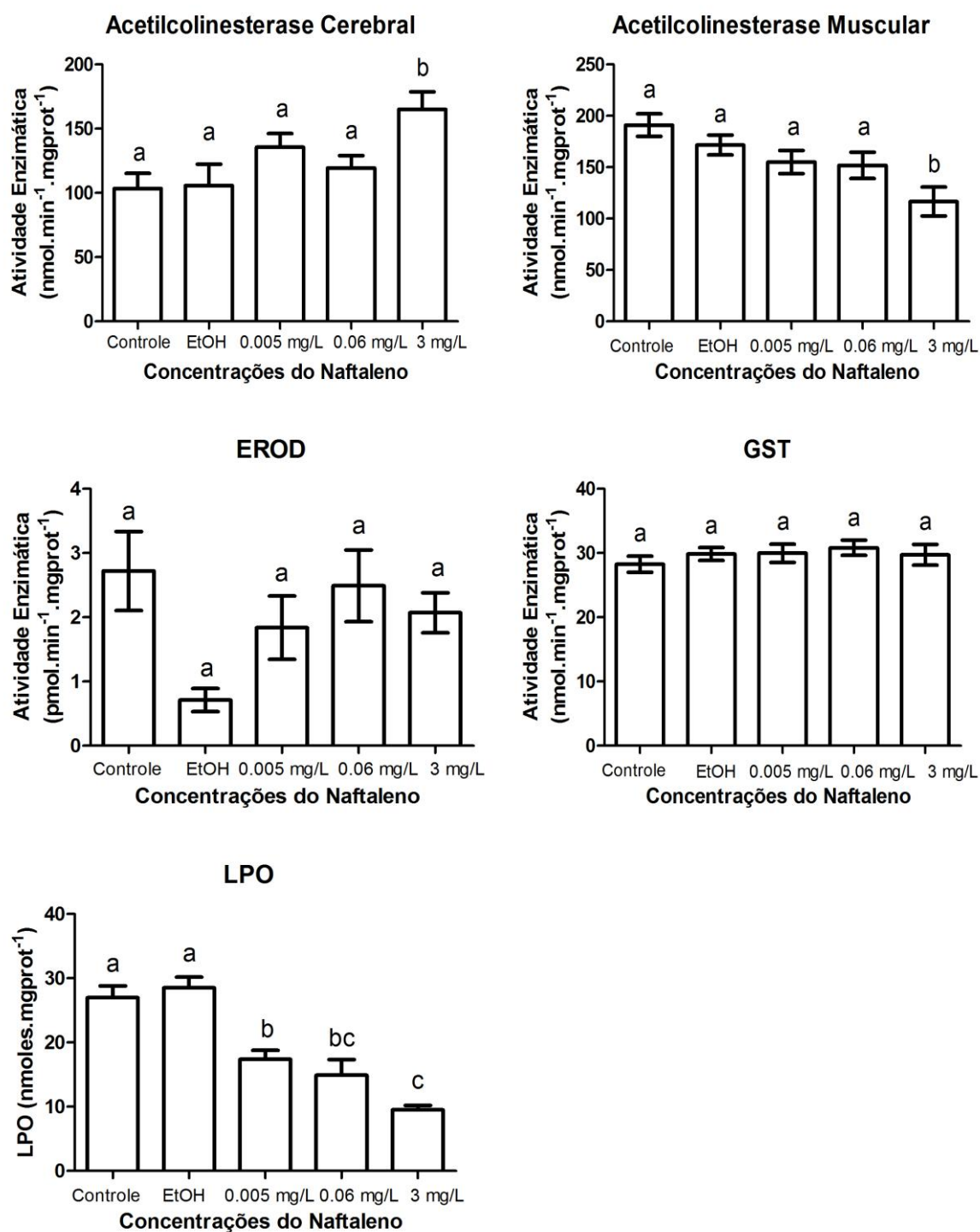


Figura 03 - Biomarcadores Bioquímicos em *R. quelen*. Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

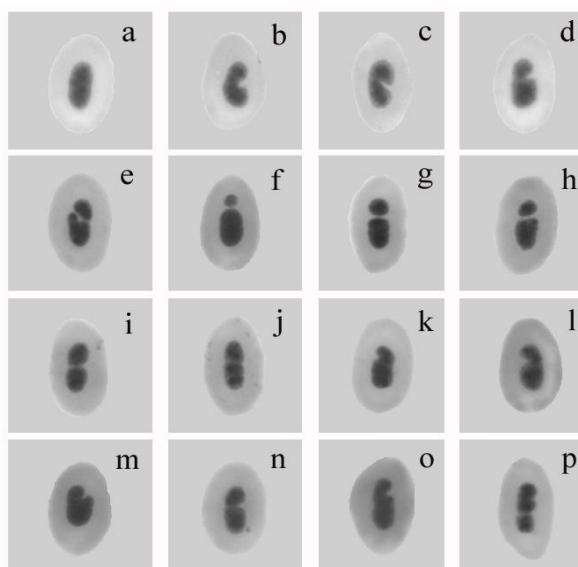


Figura 04 - Célula com núcleo normal (a) e células com alterações morfológicas nucleares (b-p) observadas nos exemplares de *Astyanax sp* expostos ao naftaleno. Aumento de 1.000x.

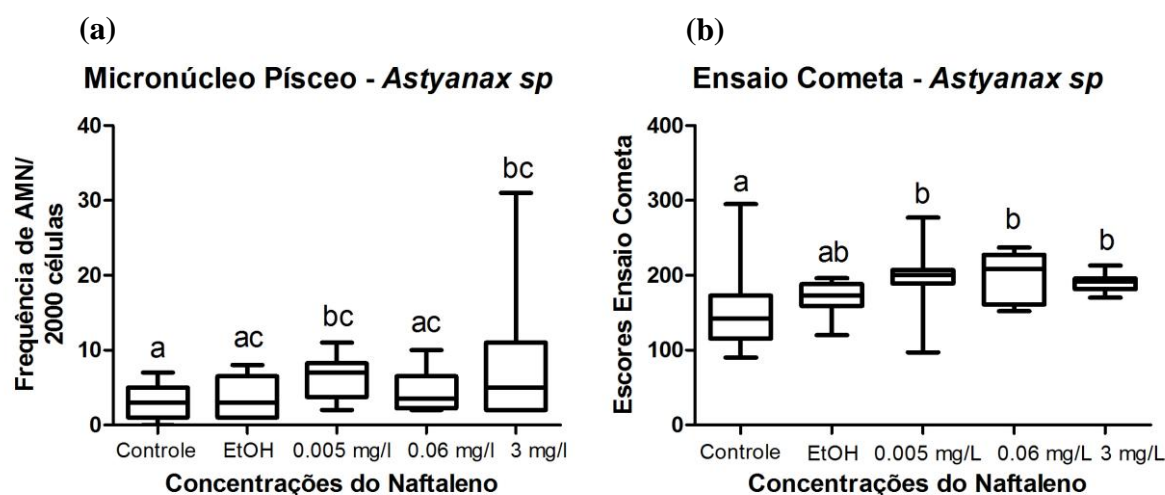


Figura 05 - Biomarcadores Genéticos em *Astyanax sp*. (a) Frequência do número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares observadas em *Astyanax sp* nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno e (b) Escores obtidos no ensaio cometa com sangue observados em *Astyanax sp* nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

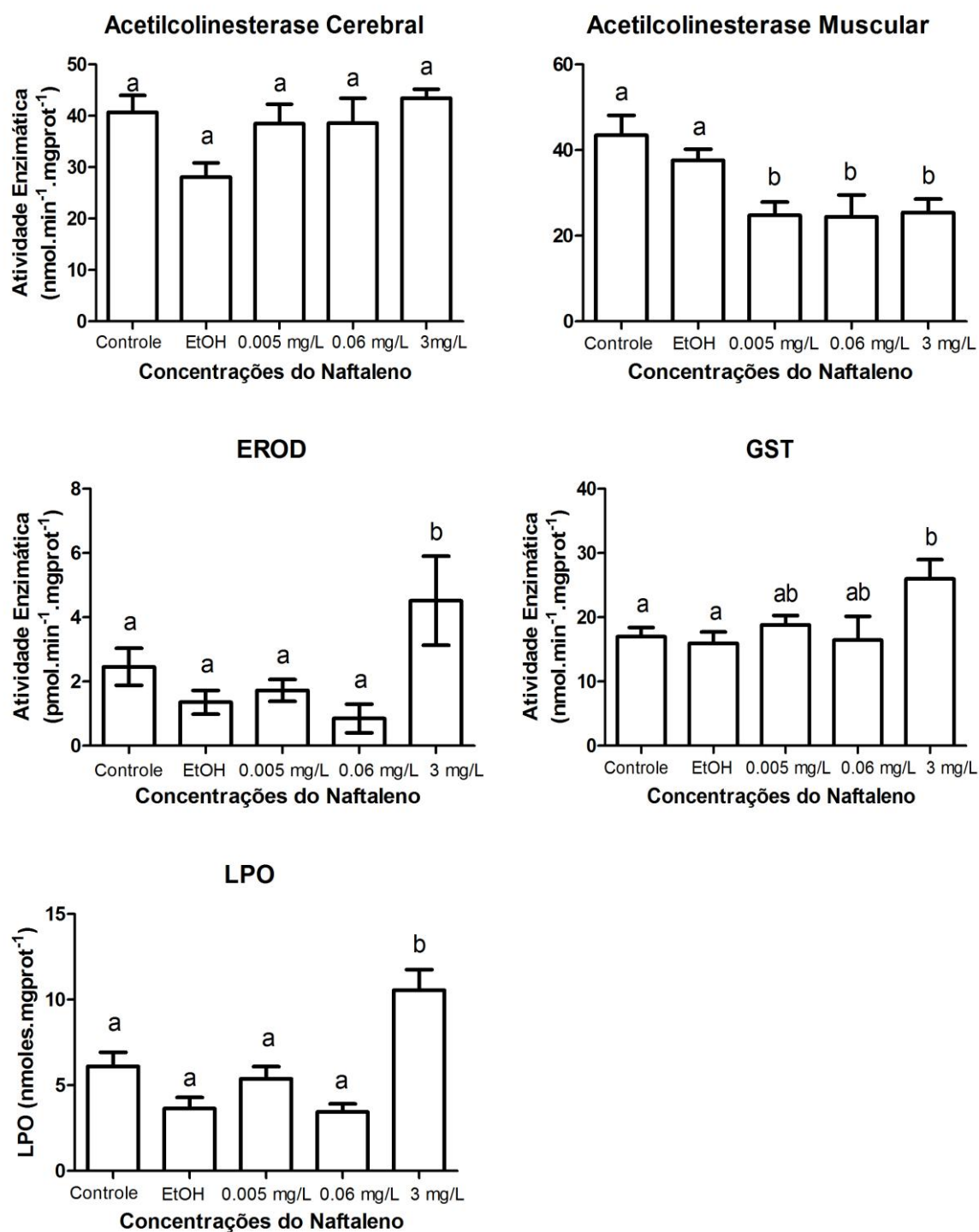


Figura 06 - Biomarcadores Bioquímicos em *Astyanax sp.* Acetilcolinesterase Cerebral e muscular, Etoxiresorufina-*O*-deetilase, Glutathione *S*-transferase e Lipoperoxidação nos diferentes grupos, controle, controle com EtOH: etanol e expostos às diferentes concentrações de naftaleno. Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Discussão Geral

No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, os critérios para classificação dos corpos de água são exclusivamente baseados em análises físicas e químicas e as análises químicas são normalmente restritas à identificação de um limitado número de contaminantes, especialmente metais, na água e fornecem pouca informação sobre a presença de contaminantes orgânicos como hidrocarbonetos e pesticidas na água e no sedimento. Dessa forma, metodologias alternativas para avaliação da qualidade da água e monitoramento ambiental são urgentemente necessárias (CAMARGO; MARTINEZ, 2006).

O impacto de poluentes na biota aquática pode ser avaliado por testes de toxicidade que são usados para detectar e avaliar os efeitos potencialmente toxicológicos de químicos nos organismos aquáticos. Entretanto, poucas pesquisas têm sido realizadas sobre o impacto de contaminantes em ecossistemas tropicais (LACHER; GOLDSTEIN, 1997).

Os efeitos de contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica. Podem ser observadas disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e alterações no comportamento, que podem resultar em prejuízo de crescimento e reprodução (ADAMS et al., 1990). As respostas biológicas ao estresse provocado por poluentes são denominadas biomarcadores e podem ser utilizadas para identificar sinais precoces de danos aos peixes. Os biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental de países desenvolvidos (WALKER et al., 1996).

A fim extrair os dados relevantes e ecologicamente significativos dos testes de toxicidade aquática, não somente testes apropriados mas também organismos apropriados devem ser usados. Quando possível, devem ser estudadas espécies que são nativas ou representativas do ecossistema que pode estar impactado (RAND; WELLS; MCCARTHY, 1995). Entretanto, poucas espécies de peixe nativas têm sido empregadas nos testes de toxicidade no Brasil. Pouco se sabe sobre a sensibilidade de espécies de peixes neotropicais aos químicos que são poluentes. Até o presente, as diretrizes toxicológicas para metais na maioria dos países tropicais são geralmente derivados de dados coletados em ecossistemas não tropicais (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 1996).

Principalmente na Europa e na América do Norte alguns biomarcadores foram padronizados para espécies locais para uso em estudos de campo. Nas espécies de peixes do Brasil, estes biomarcadores necessitam padronização para sua subsequente utilização como possíveis biomarcadores em cada espécie bioindicadora. Isso é particularmente necessário

para o uso de indicadores biológicos no ambiente aquático, especialmente devido ao fato de grande variedade de poluentes chegar a esse sistema. Espécies de peixes são usadas como bioindicadoras, uma vez que elas são prontamente expostas a diversos contaminantes antropogênicos (KLEMZ et al., 2010).

No Brasil, poucos são os estudos focando o uso de biomarcadores em espécies de peixes nativas como ferramenta para avaliação da qualidade da água (WILHELM FILHO et al., 2001; WINKALER et al., 2001; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; MARTINEZ; SOUZA, 2002; KATSUMITI et al., 2009; SILVA et al., 2009), assim como também são poucos os bioensaios realizados para verificação da toxicidade de compostos químicos nas espécies nativas. Nesse sentido, realizamos bioensaios para verificar a toxicidade de três diferentes compostos químicos (pesticida fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno) nas espécies de peixe nativas *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp.*

Rhamdia quelen, ou jundiá, é uma espécie de peixe com distribuição neotropical, sendo encontrado do sul do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É uma das espécies nativas mais promissoras para o cultivo, despertando interesse de muitos piscicultores, pois apresenta rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, fácil adaptação ao manejo em criações intensivas, boa produtividade em açudes e alto potencial de comercialização (GOMES et al., 2000). São generalistas no que diz respeito à escolha do alimento (GOMES et al., 2000), e essa característica contribui para sua adaptação ao alimento artificial, e assim, para sua domesticação. Esse fato desperta o interesse por parte de pesquisadores e produtores (CARNEIRO; MIKOS, 2005).

A revisão mais recente, realizada por LIMA et al., (2003), cita 86 espécie do gênero *Astyanax*. São conhecidos popularmente como lambaris na região Sul (BRITSKI, 1972), com a maioria das espécies onívora e hábitos de forrageamento muito ativos (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). Possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975), com papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas (SANTOS, 1981).

Danio rerio, popularmente conhecido como peixe zebra ou paulistinha, é originário da Ásia e uma espécie facilmente mantida em condições controladas de laboratório (temperatura da água em torno de $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pH $7,0 \pm 0,2$ e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro), não requer muitos cuidados para sua criação e é facilmente encontrado em lojas comerciais (WESTERFIELD, 2000). Na última década, o peixe zebra transformou-se em um organismo modelo nos campos da biomedicina, ecotoxicologia e genética (BOPP; LETTIERI, 2007). Experimentos com peixe-zebra são significativamente fáceis, rápidos e baratos (BRESOLIN, 2005). *Danio rerio* tem apresentado um interesse crescente em pesquisas nos campos da

toxicologia e da ecotoxicologia, como um organismo vertebrado não-mamífero na avaliação de risco e na regulamentação; e o sequenciamento completo do seu genoma impulsionou para que a comunidade científica reconhecesse o peixe zebra como principal organismo vertebrado nos campos acima mencionados (BOPP; MINUZZO; LETTIERI, 2006).

Para avaliação da toxicidade subcrônica do pesticida fipronil para as espécies de peixes nativas *R. quelen* e *Astyanax sp* e para a espécie exótica *D. rerio*, utilizamos concentrações relativamente baixas (0,10 µg/l o limite aceito em águas pela comunidade européia; 0,05 µg/l a metade deste limite e uma concentração ambientalmente realística: 0,23 µg/l) por período prolongado de tempo (60 dias de exposição), com reposição de 1/3 da água e do contaminante a cada 72 horas.

O fipronil é um inseticida registrado nos Estados Unidos em 1996, usado para uma variedade de pragas, inclusive como ectoparasiticida na veterinária e como defensivo agrícola, especialmente para controle de formigas. Apesar de largamente utilizado, a literatura referente aos possíveis efeitos adversos desta substância ainda é extremamente limitada (OHI et al., 2004). Sua toxicidade em peixes varia de acordo com a espécie, sendo altamente tóxico ao *Lepomis macrochirus* (CL50 96 h = 85 µg/l), à *Oncorhynchus mykiss* (CL50 96 h = 248 µg/l) e à *Cyprinus carpio* (CL50 96 h = 430 µg/l). Também é muito tóxico à *Oreochromis niloticus* (CL50 96 h = 42 µg/l) e *P. reticulata* (CL 50 96h inferior a 100 µg/l, segundo MANRIQUE, 2009), afeta o crescimento larval na *Oncorhynchus mykiss* em concentrações superiores a 6,6 µg/l (PAN-UK, 2007). Além disso, esse composto também é bioacumulado em peixes (COX, 2007). É classificado como possível carcinógeno humano (EPA, 1996). A literatura relata que alguns de seus metabólitos são ainda mais tóxicos (SCHLENK et al., 2001). Teve seu uso banido em alguns países como França, Itália, Alemanha e Eslovênia.

Um grupo teste de lambaris (*Astyanax sp*; N=15) expostos à concentração 0,63 µg/l de fipronil, também ambientalmente realística (CARY et al., 2004), apresentou morte de todos os peixes algumas horas após a primeira exposição (dados não mostrados no capítulo 2 desta tese). Esse resultado indica que a espécie *Astyanax sp* é bastante sensível ao xenobiótico fipronil em baixas concentrações. Em crustáceos, *Amphiascus tenuiremis*, essa concentração de fipronil causou diminuição do número de ovos de fêmeas e diminuiu a sobrevivência de machos (CARY et al., 2004).

Nas concentrações utilizadas (0,05; 0,10 e 0,23 µg/l) podemos verificar que o fipronil apresentou toxicidade para as espécies nativas *R. quelen* e *Astyanax sp*, tendo em vista que a exposição ao xenobiótico foi evidenciada através dos biomarcadores bioquímicos e genéticos nas duas espécies.

Em *R. quelen* os biomarcadores que apresentaram resposta frente às concentrações de fipronil foram teste do micronúcleo pisco, ensaio cometa, atividades da AchE cerebral e da GST. Em *Astyanax sp* foram o ensaio cometa e atividades da AchE muscular e da GST. Na espécie *D. rerio* somente a análise da atividade da AchE apresentou-se alterada frente às concentrações de fipronil. Concluimos assim, a necessidade de testar a toxicidade dos compostos nas espécies nativas, já que existem muitas diferenças de resposta entre as espécies. Nos bioensaios seguintes, com chumbo inorgânico e naftaleno, optamos por não utilizarmos mais a espécie *D. rerio*, tendo em vista o trabalho oneroso em sacrificar número elevado de peixes, o pequeno tamanho destes e a relativa falta de sensibilidade dessa espécie na exposição ao fipronil.

Quanto às concentrações de fipronil testadas, a concentração 0,05 µg/l, a menor utilizada nesse trabalho, alterou a atividade de AchE em *R. quelen* e na espécie *Astyanax sp* provocou quebras no DNA detectados através do ensaio cometa, provocou diminuição significativa na AchE muscular e indução de GST. As demais concentrações testadas também provocaram alterações em outros biomarcadores. Desse modo, podemos concluir que, nas concentrações testadas, o fipronil apresentou toxicidade às espécies de peixes nativas *R. quelen* e *Astyanax sp*. A concentração de fipronil em águas recomendada como segura pela Comunidade Européia (0,10 µg/l) apresenta riscos para a comunidade de peixes sendo a Legislação brasileira ainda mais falha, uma vez que não apresenta limites para esse composto em águas.

O capítulo 3 desta tese apresenta os resultados de toxicidade do chumbo inorgânico para as espécies de peixe nativas *R. quelen* e *Astyanax sp*, através da utilização de biomarcadores genéticos e bioquímicos. O chumbo é um elemento não essencial que ocorre naturalmente no ambiente, porém as concentrações mais elevadas encontradas na natureza são resultado de atividades humanas (GARCÍA-LESTÓN et al., 2010). É um metal altamente tóxico e seus efeitos biológicos conhecidos são sempre deletérios (PATTEE; PAIN, 2002). Sua toxicidade é particularmente importante devido à sua persistência no ambiente (OGUNSEITAN; YANG; ERICSON, 2000; GURER-ORHAN; SABÝR; ÖZGÜNES, 2004). O chumbo entra no sistema aquático devido à erosão superficial do solo e deposição atmosférica. A absorção de chumbo por organismos aquáticos pode ocorrer através da pele, brânquias, além da via alimentar (TAO et al., 1999).

Em condições normais, a concentração de chumbo encontrado em águas varia de 0,0006 - 0,12 mg/l (DEMAYO et al., 1982) embora concentrações tão elevadas como 0,89 mg/l já tenham sido relatadas (RTI, 1999). No Brasil, em águas de uma represa, CASTRO et

al. (1979) verificaram a concentração de chumbo de 0,04 mg/l. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estabelecia em 1976 como a concentração máxima permitida em água doce, para a sobrevivência de organismos aquáticos, a concentração de 0,03 mg/l (EPA, 1976). No Brasil, em estudo realizado por TERRA et al. (2008), a concentração de chumbo em músculo de peixes coletados no ambiente, excedeu o limite máximo permitido em peixes para consumo humano (2 µg Pb/g peixe, ANVISA, 2003).

Para avaliação da toxicidade subcrônica do chumbo inorgânico, realizamos exposições laboratoriais das duas espécies de peixes *R. quelen* e *Astyanax sp* com nitrato de chumbo, em três diferentes concentrações: 0,01 mg/l (limite aceito em águas classes 1 e 2 pelo CONAMA - Resolução 357 de 2005 - e limite aceito pela WHO, 1993) e duas concentrações ambientalmente realísticas segundo LENNTECH (2010): 0,03 mg/l e 0,10 mg/l, pelo período de 30 dias, com reposição de 1/3 da água e do contaminante a cada 72 horas.

Nas concentrações utilizadas nesse trabalho e através dos biomarcadores genéticos e bioquímicos utilizados, verificamos que o chumbo inorgânico apresentou toxicidade para as espécies nativas. Em *R. quelen*, os biomarcadores que apresentaram resposta frente às concentrações de chumbo inorgânico foram ensaio cometa com sangue, AchE muscular, EROD e LPO e em *Astyanax sp* foram o teste do micronúcleo písceo, ensaio cometa com sangue e atividades da AchE muscular e da GST.

Quanto às concentrações testadas, a concentração 0,01 mg/l de nitrato de chumbo, a menor utilizada nesse trabalho e aceita pelo CONAMA (2005), foi suficiente para aumentar a atividade de AchE muscular nas duas espécies, e em *R. quelen* provocou diminuição na atividade da EROD e diminuição dos níveis de LPO. Em *Astyanax sp*, foram observados danos ao DNA através do ensaio cometa em sangue e diminuição da atividade da GST. As concentrações comuns no ambiente, 0,03 mg/l e 0,10 mg/l, também provocaram danos ao DNA de *R. quelen* e a concentração 0,1 mg/l provocou aumento na frequência de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares em *Astyanax sp*.

Pela Resolução 357 (CONAMA, 2005), a concentração máxima de chumbo total permitida em águas de classes 1 e 2 é 0,01 mg/l. Através de nossas análises, verificamos que essa concentração foi capaz de provocar alterações bioquímicas e genéticas nas espécies de peixes *R. quelen* e *Astyanax sp*. Esses resultados indicam que essa concentração não seja a mais adequada como a aceita em nossa legislação, pois afeta parâmetros biológicos nas espécies de peixes nativas.

No capítulo 4 dessa tese verificamos a toxicidade subcrônica do naftaleno, através da utilização de biomarcadores genéticos e bioquímicos. Foram feitas exposições das duas

espécies de peixe *R. quelen* e *Astyanax sp* ao naftaleno por 28 dias, sendo que as concentrações testadas foram: 0,005 mg/l (limite estabelecido pela EPA em águas superficiais, IRWIN et al., 1997) e duas concentrações citadas na literatura, utilizadas em outras espécies de peixes: 0,06 mg/l (AAS et al., 2000) e 3 mg/l (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005), ambientalmente realísticas de locais pouco poluídos.

O naftaleno é um dos HPAs mais intensivamente estudado devido à sua alta toxicidade, baixa sensibilidade à fotoxidação, elevada persistência na água e baixo peso molecular (VIJAYAVEL et al., 2004). Em particular, o naftaleno e seus derivados como alquilnaftaleno, são os mais abundantes HPAs presentes em óleos crus (AAS et al., 2000) e freqüentemente encontrados em ambientes poluídos (LEE; ANDERSON, 2005). Acredita-se que os naftalenos e fenantrenos sejam os principais responsáveis pela toxicidade aguda do óleo cru (ANDERSON et al., 1974 *apud* POLLINO; HOLDWAY, 2002). Óleos crus contêm aproximadamente 1,5% de HPAs, dos quais o naftaleno é o principal componente perfazendo 65% da constituição de HPAs totais (TRUSCOTT; IDLER; FLETCHERET, 1992).

A exposição ao naftaleno induziu uma variedade de respostas, em nível celular e sistêmico em peixes teleósteos (NAVAS; SEGNER, 2000; TELES; PACHECO; SANTOS, 2003; THOMAS; BUDIANTARA, 1995). Em *Oncorhynchus mykiss*, exposição ao naftaleno provocou diminuição nos níveis de hormônios esteróides do plasma e afetou o metabolismo de energia em diversos órgãos, inclusive o cérebro, de maneiras dose e tempo dependentes (TINTOS et al., 2007).

O impacto do naftaleno em humanos e outros mamíferos têm sido estudados extensivamente (ORZALESI; MIGLIAVACCA; MIGLIOR, 1994). Entretanto, um número limitado de estudos tem sido conduzido para avaliar toxicidade do naftaleno em espécies aquáticas, notadamente peixes. A literatura recente da toxicidade do naftaleno em teleósteos abrange estudos de histopatologia (DI MICHELE; TAYLOR, 1978), fisiologia (KRAHM et al., 1984) e relações estrutura-toxicidade (BLACK et al., 1983). Mais recentemente, citotoxicidade (SCHIRMER et al., 1998), tempo de vida (GERT-JAN DE MAAGD et al., 1997) e respostas antioxidantes foram avaliadas. Porém, a maioria dos trabalhos que vem sendo realizados se restringem às espécies de peixes marinhos (SIMONATO; ALBINATI; MARTINEZ, 2006).

Através dos biomarcadores genéticos e bioquímicos utilizados, verificamos que o naftaleno apresentou toxicidade para as espécies de peixe nativas de água doce, mesmo em baixas concentrações. Em *R. quelen*, os biomarcadores que apresentaram resposta frente à exposição ao naftaleno foram micronúcleo písceo, ensaio cometa com sangue, AchE cerebral

e muscular e LPO. Em *Astyanax sp*, com exceção da AchE cerebral, todos os biomarcadores utilizados (teste do micronúcleo pisco, ensaio cometa com sangue, atividades da AchE muscular, da EROD e da GST e medição dos níveis de LPO) foram sensíveis à exposição ao naftaleno.

Quanto às concentrações testadas, a concentração 0,005 mg/l de naftaleno, a menor utilizada nesse trabalho, foi suficiente para induzir quebras no DNA das duas espécies estudadas, e em *R. quelen* provocou diminuição nos níveis de peroxidação lipídica. Em lambaris, *Astyanax sp*, além de aumentar os níveis de danos ao DNA observados através do ensaio cometa em sangue, o naftaleno também foi responsável pela inibição da AchE no músculo.

A concentração 3 mg/l, a mais alta utilizada em nosso trabalho, induziu aumento na frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares, aumento significativo na atividade da AchE cerebral e diminuição da AchE muscular em *R. quelen*. Em *Astyanax sp*, induziu aumento na frequência de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares, aumento na atividade das enzimas de biotransformação (EROD e GST) e aumento nos níveis de lipoperoxidação, além de diminuição da AchE muscular, que já havia sido observada na concentração 0,005 mg/l.

Desse modo, podemos concluir que nas concentrações testadas, o naftaleno apresentou toxicidade às espécies de peixes nativas de água doce *R. quelen* e *Astyanax sp*, toxicidade essa detectada através dos biomarcadores genéticos e bioquímicos.

Apesar de muito ainda se desconhecer sobre a ação dos químicos nas espécies de peixes nativas, verificamos que os biomarcadores empregados nesse trabalho apresentaram resultados satisfatórios, pois os biomarcadores apresentaram sensibilidade frente às contaminações, mesmo quando as exposições foram realizadas em baixas concentrações.

Como conclusão, verificamos a toxicidade dos compostos químicos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno para as espécies de peixe nativas *R. quelen* e *Astyanax sp*. Esses resultados indicam que as duas espécies podem ser utilizadas como bioindicadoras, pois, apesar de diferentes respostas entre as espécies, as duas apresentaram biomarcadores sensíveis para discriminar a exposição a agentes químicos com estrutura variada como, nesse caso, um pesticida com estrutura química complexa, metal inorgânico e hidrocarboneto policíclico aromático de baixo peso molecular.

Referências Bibliográficas

- AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B.; ANDERSEN, O. K. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquatic Toxicology**, 51: 241-258, 2000.
- ABUL FARAH, M.; ATEEQ, B.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2, 4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54: 25-29, 2003.
- ADAMS, S. M.; SHUGART, L. R.; SOUTHWORTH, G. R. HINTON, D. E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 333-353, 1990.
- AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H. S.; JAIN, S. K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica at Biophysica Acta**, 1523: 37-48, 2000.
- AHMAD, I.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without β -naphthoflavone pre-exposure. **Chemosphere**, 61 (2): 267-275, 2005.
- AHMED, M. K.; PARVIN, E.; MOHAMMAD, A.; ISLAM, M. M.; AKTER, M. S.; KHAN, M. S. Genetic damage induced by lead chloride in different tissues of fresh water climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch). **Environmental and Monitoring Assessment**. DOI: 10.1007/s10661-010-1869-6, 2010.
- AKAISHI, K. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JACOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; ST-JEAN, S.; COURTENEY, S. C.; LIMA, E. F.; WAGENER, A. L.; SCOFIELD, A. L.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 46 (2): 244-253, 2004.
- AKCHA, F.; HUBERT, F.V.; PFHOL-LESZKOWICZ, A. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research**, 534: 21-32, 2003.
- ALEGRE, G. F. **Avaliação ecotoxicológica de sedimentos do Rio Tietê, entre os municípios de Salesópolis e Suzano, SP**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo, 2009.
- ALMEIDA, J. S.; MELETTI, P. C.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 140: 356-363, 2005.

ALMLI, B. EGAAS, E.; LODE, O. Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). **Marine Environmental Research**, 54 (3-5): 237-240, 2002.

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 85: 5-9, 1986.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, 343: 121-135, 1995.

ANVISA, 2003. Legislação específica para a área de alimentos - contaminantes inorgânicos (metais pesados) em peixes e produtos de pesca. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.

ANVISA, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 de fev de 2011.

AOYAMA, K.; IWAHORI, K.; MIYATA, N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. **Mutation Research**, 538: 155-162, 2003.

ARINÇ, E.; SEN, A.; BOZCAARMUTLU, A. Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. **Pure and Applied Chemistry**, 72 (6): 985-994, 2000.

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 25: 33-38, 2008.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995. **Toxicological profile for naphthalene, 1-methylnaphthalene, and 2-methylnaphthalene**. Atlanta: G.A.: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.html>. Acesso em: 25 set. 2008.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007. **Toxicological profile for lead**. Atlanta: G.A.: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&tid=22>. Acesso em: 10 out. 2008.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, 467: 177-186, 2000.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49: 221-225, 2001.

AZEVEDO, F. A; CHASIN, A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: Editora Rima (interfox), 340p, 2004.

BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, 142 (3): 335-341, 2005.

BAKER, R. C.; KRAMER, R. E. Cytotoxicity of short-chain alcohols. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 39: 127-150, 1999.

BALANÇA, G.; DE VISSCHER, M. Impacts on non-target insects of a new insecticide compound used against the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forsk. 1775). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 32: 58-62, 1997.

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2004.

BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; MEDEIROS, S. R. B. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 320-325, 2010.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A. B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, 34: 1565-1469, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29: 113-123, 2006.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. **Inseticidas Registrados para a Cultura do Arroz e Análise de Parâmetros Indicadores de seu Comportamento no Ambiente**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 74), 2005.

BASHA, P. S.; RANI, A. U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56: 218-221, 2003.

BATZIAS, F. A.; SIONTOROU, C. G. A knowledge-based approach to environmental biomonitoring. **Environmental and Monitoring Assessment**, 123: 167-197, 2006.

BEAUVAIS, S. L.; JONES, S. B.; PARRIS, J. T.; BREWER, S. K.; LITTLE, E. E. Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49: 84-90, 2001.

BEELER, A. B.; SCHLENK, D. K.; RIMOLDI, J. M. Synthesis of fipronil sulfide, an active metabolite, from the parent insecticide fipronil. **Tetrahedron Letters**, 32: 5371-5372, 2001.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia - de Indivíduos a Ecossistemas** 4 a. Ed., ARTMED, 2007.

BELFIORE, N. M.; ANDERSON, S. L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. **Mutation Research**, 489: 97-122, 2001.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, 415 (3): 167-84, 1998.

BERVOETS, L.; VAN CAMPENHOUT, K.; REYNDERS, H.; KNAPEN, D.; COVACI, A.; BLUST, R. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72: 720-728, 2009.

BEYER, J.; SANDVIK, M.; HYLLAND, K.; FJELD, E.; EGAAS, E.; AAS, E.; SKÁRE, J. U.; GOKSØYR, A. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sør fjorden, Norway. **Aquatic Toxicology**, 36: 75-98, 1996.

BLACK, J. A.; BIRGE, W. J.; WESTERMAN, A. G.; FRANCIS, P. C. Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. **Fundamental and Applied Toxicology**, 3(5): 353-358, 1983.

BLASIAK, J.; TRZECIAK, A.; MALECKA-PANAS, E.; DRZEWOSKI, J.; WOJEWÓDZKA, M. In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. **Toxicology In Vitro**, 14: 287-295, 2000.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AchE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, 30: 75-89, 1990.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, 543: 251-272, 2003.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, 44: 383-392, 2001.

BOPP S. K., LETTIERI, T. **Gene Expression Profile Assessment in Zebrafish (*Danio rerio*)** EUR 23094 EN – Joint Research Centre – Institute for Environment and Sustainability. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2007.

BOPP, S. K.; MINUZZO, M.; LETTIERI, T. **The Zebrafish (*Danio rerio*): an Emerging Model Organism in the Environmental Field**, EUR 22598 EN, Joint Research Centre - Institute for Environment and Sustainability. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, Italy, 2006.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BRAUNBECK, T. P.; BURKHARDT-HOLM, G.; GORGE, R.; NAGEL, R. D.; STORCH, D. V. **Rainbow trout and zebrafish, two models for continuous toxicity tests: relative sensitivity, species and organ specificity in cytopathologic reaction of liver and intestines to atrazine.** *Schriftenr Ver Wasser Boden. Lufthyg*, 89: 109-145, 1992.

BRESOLIN, T. **Expressão dos genes Receptor Pregnano X (PXR), Citocromo P4503A (CYP3A) e Resistência a Multidrogas 1 (MDR1) em fígado de peixe-zebra (*Danio rerio*).** Dissertação de Mestrado, Florianópolis, 2005.

BRETAUD, S.; TOUTANT J.; SAGLIO P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in Goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 47: 117-124, 2000.

BRITSKI, H. A. **Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática.** São Paulo: USP, Faculdade de Saúde Pública; Instituto de Pesca, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias:** (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Brasília: CODEVASF, 1988.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, 5: 201-268, 1995.

BUCKUP, P.A. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES- NETO, P. R. **Ecologia de Peixes de Riachos.** Rio de Janeiro: Série Oecologia Brasiliensis, PPGE-UFRJ, 6: 91-138, 1999.

BUET, A.; BANAS, D.; VOLLAIRE, Y.; COULET, E.; ROCHE, H. Biomarker responses in European eel (*Anguilla Anguilla*) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccarés lagoon (Camargue, France). **Chemosphere**, 65: 1846-1858, 2006.

BURDENA, V. M.; SANDHEINRICH, M. B.; CALDWELL, C. A. Effects of lead on the growth and 6-aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Pollution**, 101: 285-289, 1998.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. **Drug Metabolism and Disposition**, 2: 583-588, 1974.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, 247: 201-212, 2000.

CAMARGO, M. M. P; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21: 61-69, 2006.

CAMPANA, M. A.; PANZERI, A. M.; MORENO, V. J.; DULOUT, F. N. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**, 438: 155-161, 1999.

CAMPANA, O.; SARASQUETE, C.; BLASCO, J. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 55 (1): 116-125, 2003.

CANONICO, B.; ZAMAI, L.; BURATTINI, S.; GRANGER, V.; MANNELLO, F.; GOBBI, P.; FELICI, C.; FALCIERI, E.; REILLY, J. T.; BARNETT, D.; PAPA, S. Evaluation of leukocyte stabilisation in TransFix[®]-treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Journal of Immunological Methods**, 295: 67-78, 2004.

CAO, L.; HUANG, W.; LIU, J.; YIN, X.; DOU, S. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 151: 386-392, 2010.

CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, 35 (1): 187-191, 2005.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 47: 2123-2136, 1990.

CARY, T. L.; CHANDLER, G. T.; VOLZ, D. C.; WALSE, S. S.; FERRY, J. L. The phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. **Environmental Science & Technology**, 38: 522-528, 2004.

CASTRO, N.; BAUCH, T.; KAWAI, H. HESPANHOL, I.; **O problema das espumas formadas no Rio Tietê e na Represa Billings em São Paulo: presença de alquilbenzenosulfonatos, íons metálicos e microrganismos**. In: 10º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Manaus, São Paulo, CETESB, 1-9, 1979.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup[®] on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, 655: 41-46, 2008.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, 538: 81-91, 2003.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, 74: 264-271, 2005.

ÇAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, 43: 569-574, 2005.

CDPR. **California Department of Pesticide Regulation**. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/pur/pur05rep/chmrpt05.pdf>, pp. 170, 2005.

CERÓN, J. J.; FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; GUTIERREZ-PANIZO, C.; ANDREU-MOLINER, E. Effects of Diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 35: 222-225, 1996.

CERUTTI, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science**, 227: 375-381, 1985.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; van ZANDEN, J.; van BLADEREN, P. The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 10: 141-152, 2001.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 30 (2): 139-146, 1997.

COLLIOT, F.; KUKOROWSKI, K. A.; HAWKINS, D. W.; ROBERTS, D. A. **Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide**. Proceedings of Brighton crop protection conference pests and diseases, 11: 29-34, 1992.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB 1980. In ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1a edição, 2006.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo. São Paulo: Relatórios/Secretaria do Meio Ambiente, 2008.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. Ficha de Informação de Produto Químico – NAFTALENO. São Paulo: Relatórios/Secretaria do Meio Ambiente, 2010. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=NAFTALENO. Acesso em 10 dez 2010.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 357**, 17 de março de 2005.

CONNELLY, P. **Environmental fate of fipronil**: California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation. 2001. Disponível em: <http://la.water.usgs.gov/pdfs/NAWQA-fipronil.pdf>. Acesso em: 10 mai 2007.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, 157: 57-63, 2009.

CORREA, L. M.; KOCHHANN, D.; BECKER, A. G.; PAVANATO, M. A.; LIESUY, S. F.; LORO, V. L.; RAABE, A.; MESKO, M. F.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Biochemistry, cytogenetics and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Aquatic Toxicology**, 88: 250-256, 2008.

COSTA, J. R. M. A.; MELA, M.; ASSIS, H. C. S.; PELLETIER, E.; HANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Enzymatic inhibition and morphological aspects as biomarker to dietary lead (II) and methylmercury exposure to neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 67: 82-88, 2007.

COTELLE, S.; FERARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 34: 246-255, 1999.

COX, C. **Fipronil**. Disponível em: <http://www.pesticide.org/fipronil.pdf>. Acesso em: 12 ago 2007.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

De FLORA, S.; VINGANÒ, L.; D'AGOSTINI, F.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, 319 (3): 167-177, 1993.

De LEMOS, C. T.; RODEL, P. M.; TERRA, N. R.; ERDTMANN, B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20: 1320-1324, 2001.

DE LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. Poluição: Causas, efeitos e controle. **Genética Toxicológica**: 119-137, 2003.

DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTIZ-MARTTELO, R.; GRAF, U.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GOMEZ-ARROY, S. Genotoxicity activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitroderivatives in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, 341: 235-247, 1995.

DEMAYO, A.; TAYLOR, M. C.; TAYLOR, K. W.; HODSON, P. V. Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 12 (4): 257-305, 1982.

DEMBÉLÉ, K.; HAUBRUGE, E.; GASPAR, C. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 45: 49-54, 2000.

DEMCHECK, D. K.; SKROBIALOWSKI, S. C. **Fipronil and degradation products in the rice-producing areas of the Mermentau River Basin, Louisiana, February september 2000**. United States Geological Survey National Water-Quality Assessment Program. USGS. Estados Unidos, 2003. Disponível em: <<http://water.usgs.gov/nawqa>>. Acesso em: 11 jun 2008.

DEVAUX, A.; PESONEN, M.; MONOD, G. Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, 11: 71-79, 1997.

DEWEZ, D.; GEOFFROY, L.; VERNET, G.; POPOVIC, R. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. **Aquatic Toxicology**, 74: 150-159, 2005.

DI MICHELE L.; TAYLOR, M. H. Histopathological and physiological responses of *Fundulus heteroclitus* to naphthalene exposure. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, 35 (8): 1060-1066, 1978.

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, 3: 1-10. 2002.

DONALDSON, W. E.; KNOWLES, S. O. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membrane? **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 104: 377-379, 1993.

DUBOCHET, J.; SARTORI BLANC, N. The cell in absence of aggregation artifacts. **Micron** 32 (1): 91-99, 2001.

EGGEN, R. I.; BEHRA, R.; BURKHARDT-HOLM, P.; ESCHER, B. I. SCHWEIGERT, N. Challenges in ecotoxicology. **Environmental Science and Technology**, 38: 58-64, 2004.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College), 43 (3): 209-310, 1921. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology (Harvard College), 43 (4): 311-428, 1927. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 1997.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7: 88-95, 1961.

ELUMALAI, M., BALASUBRAMANIAN, M. P. Influence of naphthalene on esterase activity during vitellogenesis of marine edible crab *Scylla serrata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 62 (6): 743-748, 1999.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Quality criteria for water**. Washington, D.C., Pre-Publication Copy, 1976.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY **Pesticide Fact Sheet: Fipronil**. Office of prevention, pesticides, and toxic substances, Washington, DC. EPA-737-F-96-05, 8p. 1996.

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; CELIK, A.; KOLELI, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 48: 421-429, 2007.

ESPINA, N. G.; WEISS, P. DNA repair in fish from polluted estuaries. **Marine Environmental Research**, 39: 309-312, 1995.

FAOUDER, J. L.; BICHON, E.; BRUNSCHWIG, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; BIZEC, B. Le. Transfer assessment of Fipronil residues from feed to cow Milk. **Talanta**, 73: 710-717, 2007.

FENG, T.; LI, Z. B.; GUO, X. Q.; GUO, J. P. Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulphate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica* in vitro. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 92: 107-113, 2008.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, 141: 1-5, 2004.

FERRARI, A.; ANGUIANO, O. L.; SOLEÑO, J.; VENTURINO, A.; PECHÉN DE D'ANGELO, A. M. Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 139: 239-243, 2004.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação do efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PbII) em *Hoplias malabaricus* (Pisces) através dos ensaios: Cometa, Micronúcleo e de Aberrações Cromossômicas**. Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2003.

FERRARO, M. V.; FENOCCHIO, A. S. ; MANTOVANI, M. S. ; CESTARI, M. M. ; RIBEIRO, C. A. O. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay, piscine micronucleous and chromosome aberrations tests. **Genetics and Molecular Biology**, 27 (1): 103-107, 2004.

FERREIRA, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; REIS-HENRIQUES, M. A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. **Aquatic Toxicology**, 71: 39-48, 2005.

FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C.; KINDL, H.; KÜHN, H. Lipoxygenase catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination of cucumber. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92: 11849-11853, 1995.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 72 (4): 297-353, 1981.

FISHBASE. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. 2010.

FOE, 2000. Friends of the Earth. Protecting Groundwater from pesticides: a clean water action guide, section one: the large and varied world of pesticides. Pesticide Basics, disponível em <http://www.foe.org/safefood/groundwater/one.html>, apud MARTINS, P. R. **Trajetórias tecnológicas e meio ambiente: a indústria de agroquímicos/transgênicos no Brasil**, UNICAMP, 2000.

FOUCHÉCOURT, M. O.; ARNOLD, M.; BERNY, P.; VIDEMANN, B.; RETHER, B.; RIVIERE, J. L. Assessment of the bioavailability of PAHs in Rats exposed to a polluted soil by natural routes: induction of EROD activity and DNA adducts and PAH burden in both liver and lung. **Environmental Research**, 80: 330-339, 1999.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, 681 (1): 80-92, 2009.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; SCARCELLI, V.; GORGI, S.; REGOLI, F. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutropicated coastal lagoon. **Aquatic Toxicology**, 53: 19-32, 2001.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FÖRLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. **Mutation Research**, 552: 187-195, 2004.

FU, H.; BOFFETTA, P. Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, 52: 73-81, 1995.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology & Chemistry**, 20: 37-45, 2001.

GALGANI, F.; BOCQUENÉ, G.; CADIOU, Y. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. **Marine Ecology Progress Series**, 91: 72-82, 1992.

GALLOWAY, T. S.; BROWN, R. J.; BROWNE, M. A. DISSANAYAKE, A.; LOWE, D.; JONES, M. B. A multibiomarker approach to ecosystem management. **Environmental Science & Technology**, 38: 1723-1731, 2004.

GARCÍA-LESTÓN, J.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E.; LAFFON, B. Genotoxic effects of lead: An updated review. **Environment International**, 36: 623-636, 2010.

GEORGE, S. G.; WRIGHT, J.; CONROY, J. Temporal studies of the impact of the Braer oil spill on inshore feral fish from Shetland, Scotland. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 29: 530-534, 1995.

GERT-JAN DE MAAGD, P.; VAN DE KLUNDERT I. C. M.; VAN WEZEL, A. P.; OPPERHUIZEN, A.; SIJM, D. M. Lipid content and time-to-death-dependent lethal body burdens of naphthalene and 1, 2, 4-trichlorobenzene in fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 38 (3): 232-237, 1997.

GÈRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publ., 1977.

GESTO, M.; TINTOS, A.; RODRÍGUEZ-ILLAMOLA, A.; SOENGAS, J. L.; MÍGUEZ, J. M. Effects of naphthalene, β -naphthoflavone and benzo(a)pyrene on the diurnal and nocturnal indoleamine metabolism and melatonin content in the pineal organ of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**, 92: 1-8, 2009.

GILL, T. S.; TEWARI, H.; PANDE, J. Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 97: 287-292, 1990.

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characidae**. Ed. Franciscana. São Paulo, v. 4, p. 847, 1975.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D. R.; STEGEMAN, J. J.; WILLIAMS, D. E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity of β -naphthoflavone - inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology and Biochemistry**, 9: 1-13, 1991.

GOKSOYR, A.; FORLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, 22: 287-312, 1992.

GOMES, L. C.; CHIPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 32 (4): 426-431, 2001.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, 30 (1): 179-185, 2000.

GORBI, S.; REGOLI, F. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: Seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. **Marine Environmental Research**, 58: 511-515, 2004.

GRANT, D. B.; CHALMERS, A. E.; WOLFF, M. A.; HOFFMAN, H. B.; BUSHEY, D. F. Fipronil: action on the GABA receptor. **Reviews in Toxicology**, 2: 147-156, 1998.

GraphPad Software, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad software.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. Juvenile sea bass liver P450 EROD induction and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 51: 115-127, 2002.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, 518: 145-150, 2002.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detect by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, 426: 183-188, 1999.

GRUE, C. E.; HART, A. D. M.; MINEAU, P. Biological consequences of depressed brain cholinesterase in wildlife. In: MINEAU, P. (Ed.), **Cholinesterase Inhibiting Insecticides; Their Impact on Wildlife and Environment**. Elsevier Science, New York, 8: 151-210, 1991.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 70 (3): 411-421, 2008.

GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M. C.; SOARES, A. M. V. M. Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphates and carbamate pesticides be questioned? **Biomarkers**, 3: 157-163, 1998.

GUILHERMINO, L.; LACERDA, M. N.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. M. V. M. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. **Science of the Total Environment**, 247: 137-141, 2000.

GUIMARÃES, A. T. B.; SILVA DE ASSIS, H. C.; BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 68: 57-62, 2007.

GUNASEKARA, A. S.; TROUNG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of Fipronil. **Journal of Pesticide Science**, 32 (3): 189-199, 2007.

GURER-ORHAN, H.; SABÝR, H. U.; ÖZGÜNES, H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology**, 195: 147-154, 2004.

HAI, D. Q.; VARGA, I. S.; MATKOVICS, B. Effects of an organophosphate on the antioxidant systems of fish tissues. **Acta Biologica Hungarica**, 46: 39-50, 1995.

HAINZL, D.; COLE, L. M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chemical Research in Toxicology**, 11 (12): 1529-1535, 1998.

HARTWIG, A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. **Environmental Health Perspectives**, 102 (3): 45-50, 1994.

HARVEY, J. S.; LYONS, B. P.; PAGE, T. S.; STEWART, C.; PARRY, J. M. An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adducts levels in selected invertebrate and vertebrate species. **Mutation Research**, 441: 103-114, 1999.

HARVEY, R. G. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenesis**, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1991.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. **Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 399 (2): 125-133, 1998.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, 18: 187-192, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, P. H.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 18: 277-291, 1991.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELAN, R. A.; OKIHIRO, M. S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopatological markers of antropogenic stress**. Lewis Publishers, 155-208, 1992.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, JR., G. A.; CAIRNS JR, J. (Eds) 2003. **Handbook of ecotoxicology**. 2 edition. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

HOGSTRAND, C.; FERGUSON, E. A.; GALVEZ, F.; SHAW, R.; WEBB, N. A.; WOOD, C. M. Physiology of acute silver toxicity in the starry flounder (*Platichthys stellatus*) in seawater. **Journal of Comparative Physiology B**, 169: 461-473, 1999.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, 104: 147-152, 1982.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE JR., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

HUTTER, K. J.; STOHR, M. Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry. **Histochemistry** 75 (3): 353-362, 1982.

HWANG, E. S.; KIM, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. **Toxicology**, 229: 1-10, 2007.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Monographs, Suppl. 6: 351-354, 1987.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. ADVISORY GROUP TO PLAN VOLUME 100: A Review of human carcinogens. France: 2006. Disponível em: monographs.iarc.fr/ENG/Publications/internrep/07-001.pdf.

INCARDONA, J.; STEHR, C.; LINBO, T.; SCHOLZ, N. Fipronil causes locomotor defects in developing zebrafish. **Marine Environmental Research**, 62 (Suppl.1): S38-S78, 2006.

IRWIN, R. J., VANMOUWERIK, M., STEVENS, L., SEESE, M. D., BASHAM, W., **Environmental contaminants encyclopedia**. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado, 114pp, 1997.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. **Analytical Biochemistry**, 202 (2): 384-389, 1992.

JIFA, W.; ZHIMING, Y.; XIUXIAN, S.; YOU, W.; XIHUA, C. Comparative researches on effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate upon *Lateolabrax japonicus* biomarker system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 20: 465-470. 2005

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research, Reviews in Mutation Research**, 410: 123-140, 1998.

JOHNSON, L. L.; LANDAHL, J. T.; KUBIN, L. A.; HORNESS, B. H.; MYERS, M. S.; COLLIERS, T. K.; STEIN, J. E. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations. **Journal of Sea Research**, 39: 125-137, 1998.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; ARANTES, M. R.; MEIRELLES, M. S.; VANNUCCHI, H. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and Chemical Toxicology**, 42 (3): 459-464, 2004.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; DOMENICI, F. A.; LATARO, R. C.; PORTARI, G. V.; VANNUCCHI, H. Effect of methionine load on homocysteine levels, lipid peroxidation and DNA damage in rats receiving ethanol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 45 (4): 709-714, 2009.

KAKKAR, P.; JAFFERY, F. N. Biological markers for metal toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19: 335-349, 2005.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, 498: 67-77, 2001.

KAPPUS, H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chemistry and Physics of Lipids**, 45: 105-115, 1987.

KATSUMITI, A.; VALDEZ DOMINGOS, F. X.; AZEVEDO, M.; DA SILVA M. D.; DAMIAN, R. C.; ALMEIDA, M. I. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FREIRE, C. A. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. **Environmental and Monitoring Assessment**, 152: 209-222, 2009.

KAYAL, S. I., CONNEL, D. W. Occurrence and distribution of polycyclic aromatics hydrocarbons in surface sediments and water from the Brisbane river estuary. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 29: 473-487, 1989.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities from glutathione *S*-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, 251: 6183-6188, 1976.

KELLY, K. A.; HAVRILLA, C. M.; BRADY, T. C.; ABRAMO, K. H.; LEVIN, E. D. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environmental Health Perspectives**, 106 (7): 375-384, 1998.

KIM, I. Y.; HYUN, C. K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64: 288-297, 2006.

KIRBY, M. F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S. J.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, 40: 780-791, 2000.

KIRBY, M. F.; NEALL, P.; TYLOR, T. EROD activity measured in flatfish from the area of the Sea Empress oil spill. **Chemosphere**, 38: 2929-2949, 1999.

KLEINOW, K. M.; MELANCON, M. J.; LECH, J. J. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. **Environmental Health Perspectives**, 71: 105-119, 1987.

KLEMZ, C.; SALVO, L. M.; BASTOS NETO, J. C.; BAINY, A. C. D.; SILVA DE ASSIS, H. C. Cytochrome P450 detection in liver of the catfish *Ancistrus multispinis* (Osteichthyes, Loricariidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53 (2): 361-368, 2010.

KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Efeitos do endossulfano na atividade da acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, Fish, Teleostei). **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, 3 (4): 51-58, 2005.

KLOBUCAR, G. I. V.; PAVLICA, M.; ERBEN, R.; PAPES, D. E. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. **Aquatic Toxicology**, 64: 15-23, 2003.

KLUMPP, D. W.; HUASHENG, H.; HUMPHREY, C.; XINHONG, W.; WODI, S. Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. Organic pollutants in mussel and fish tissues. **Marine Pollution Bulletin**, 44 (8): 752-760, 2002.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004

KOCA, S.; KOCA, Y. B.; YILDIZ, S.; GURCU, B. Genotoxic and histopathological effects of water pollution on two fish species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Buyuk Menderes River, Turkey. **Biological Trace Element Research**, 122: 276-291, 2008.

KRAHM, N. M.; MYERS, M. S. ; BURROWS, D. G.; MALINS, D. C. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. **Xenobiotica**, 14 (8): 633-646, 1984.

KUMAR, R.; NAGPURE, N. S.; KUSHWAHA, B. SRIVASTAVA, S. K.; LAKRA, W. S. Investigation of the genotoxicity of Malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 58: 123-130, 2010.

KUMAR, P.; SATCHIDANANDAM, V. Ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether) tetraacetate as a blood anticoagulant: preservation of antigen-presenting cell function and antigen-specific proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from stored blood. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 7 (4): 578-583, 2000.

KURELEC, B. The genotoxic disease syndrome. **Marine Environmental Research**, 35: 341-348, 1993.

LACHER, T. E.; GOLDSTEIN, M. I. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 16 (1): 100-111, 1997.

LAM, P. K.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, 46: 182-186, 2003.

LANGE, U. **Natürliche Variabilität des Schadstoffinduzierbaren Cytochroms P450 1A in der Leber von Klieschen (*Limanda limanda* [L.]) aus der Nordsee**. Berichte aus dem Zentrum für Meers- und Klimaforschung - ZMK. Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft. Hamburg, 1996.

LAWS, E. A. (1993) **Aquatic Pollution: an introductory text**. John Wiley and Sons, Inc.

LEE, R. F.; ANDERSON, J. W. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, 50: 705-723, 2005.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, 544: 43-64, 2003.

LEGGETT, R. W. An age specific kinetic model of lead metabolism in humans. **Environmental Health Perspectives**, 101: 598-616, 1993.

LE MOS, N. G.; DIAS, A. L.; SILVA-SOUZA, A. T.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19: 197-201, 2005.

LENNTech, 2010. **Water Treatment Solutions**. Disponível em: <http://www.lenntech.com/periodic/water/lead/lead-and-water.htm>. Lead (Pb) and water.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, M. F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, 46: 324-330, 2003.

LIVINGSTONE, D. R. Responses of the detoxication/toxication enzyme systems of molluscs to organic pollutants and xenobiotics. **Marine Pollution Bulletin**, 16: 158-164, 1985.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 57: 195-211, 1993.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 120: 43-49, 1998.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, 42: 656-666, 2001.

LU, G. H.; WANG, C.; ZHU, Z. The dose-response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 82 (2): 194-199, 2008.

LUDKE, L. K.; HILL, E. F.; DIETEER, M. P. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 3 (1): 1-21, 1975.

LYONS, B. P.; HARVEY, J. S.; PARRY, J. M. An initial assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in the intertidal teleost *Lipophrys pholis*. **Mutation Research**, 390: 263-268, 1997.

MACHELLA, N.; BATTINO, M.; PISANELLI, B.; REGOLI, F. Influence of the SCGE protocol on the amount of basal DNA damage detected in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 47: 579-586, 2006.

MALMSTRÖM, C. M.; KOPONEN, K.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; BYLUND, G. Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 58: 365-372, 2004.

MANRIQUE, W. G. **Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do Fipronil para o guaru (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático**. Dissertação de Mestrado, Jaboticabal, 2009.

MARIA, V. L.; GRAVATO, C.; CORREIA, A. C.; SANTOS, M. A. Biotransformation and genotoxicity responses to PAHs in two teleost species. **Fresenius Environmental Bulletin**, 11: 609-615, 2002.

MARIONNET, D.; DESCHAUX, P.; REYNAUD, S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish and Shellfish Immunology**, 21: 80-91, 2006.

MARTINEZ, C. B. R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: SILVA-SOUZA, Â. T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Maringá: ABRAPOA: 43-62, 2006.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, A. O.; PIMENTA, J. A. (Eds.), **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina, Paraná, BR: 551-577, 2002.

MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 133: 151-160, 2002.

MASON, R. P.; WALTER, M. F.; MASON, P. E. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. **Free Radical Biology & Medicine**, 23: 419-425, 1997.

MATSUO, A. Y. O.; GALLAGHER, E. P.; TRUTE, M.; STAPLETON, P. L.; LEVADO, R.; SCHLENK, D. Characterization of Phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 147: 78-84, 2008.

MAURER, H. R. Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture, in: FRESHNEY, R. I. (Ed.), **Animal Cell Culture: A Practical Approach**, Oxford, IRL Press, pp. 13–30, 1986.

MAYER, R.; ELLERSIECK, M. **Manual of Acute Toxicity: Interpretation and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals**, Resource Publication No. 160. US Department of the Interior, Washington, DC, 1986.

McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis, Boca Raton, USA, 1990.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. **Free Radical Biology & Medicine**, 28 (12): 1745-1750, 2000.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 11 (2): 188-201, 2007.

MELO, F. A. G. **Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Teleostei, Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos**. Arq. Nac. Rio de Janeiro, 59: 1-46, 2001.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M. N.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research**, 371: 47-55, 1996.

METCALFE, C. D. Testes for Predicting Carcinogenicity in Fish. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**, 1: 111-129, 1989.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, 367: 245-251, 1996.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, 399: 135-147, 1998.

MIZE S. V.; PORTER S. D.; DEMCHECK, D. K. Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA, **Environmental Pollution**, 152: 491-503, 2008.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup[®] causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, 78: 294-299, 2010.

MONTSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A., AMADO, L. L.; MARTINS, C. M.; PINHO, G. L.; CHAVES, I. S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 146: 221-234, 2007.

MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research**, 552: 247-268, 2004.

MOREIRA-FILHO, O. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae).** Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1989.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO FILHO, S.A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. **Caryologia**, 36 (3): 235-244, 1983.

MYERS, C. R. Subcellular sites of xenobiotic-induced free-radical generation. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 1997. p. 25-44.

NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, 35: 197-210, 1996.

NAGALAKSHMI, N.; PRASAD, M. N. V. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: protective role of free radical scavengers. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 61: 623-628, 1998.

NAVAS, J. M.; SEGNER, H. Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. **Aquatic Toxicology**, 51: 79-92, 2000.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4 ed., John Wiley & Sons, 2006.

NETTO, A. D. P.; DIAS, J. C. M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L. F.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica, **Química Nova**, 23 (6): 765-773, 2000.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis*.** Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2004.

NICOLAS, J. M., Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. **Aquatic Toxicology**, 45 (2-3): 77-90, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, 31 (11): 1287-1311, 2001.

OBERDÖRSTER, E. ; MARTIN, M. ; IDE, C. F. ; MCLACHLAN, J. A. Benthic community structure and biomarker induction in grass shrimp in an estuarine system. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 37: 512-518, 1999.

OGUNSEITAN, O. A.; YANG, S.; ERICSON, J. Microbial δ -aminolevulinate dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments. **Soil Biology & Biochemistry**, 32: 1899-1906, 2000.

OHI, M. **Efeitos reprodutivos e tóxicos do Fipronil (Frontline® Top-Spot™) em ratos**. Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2002.

OHI, M.; DALSENTER, P. R.; ANDRADE, A. J. M. ; NASCIMENTO, A. J. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. **Toxicology Letters**, 146: 121-127, 2004.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiation Research**, 122: 86-94, 1990.

OLIVEIRA, C. P. M. S. **Efeito da silimarina e verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática: citoproteção e redução do estresse oxidativo**. Tese de doutorado, São Paulo, 1999.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Evaluation of cytotoxic effects of Fipronil on ovaries of semi-engorged *Hipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick female. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 2459-2465, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; GRISOLIA, C. K.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Effects of endosulfan and ethanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: A multigeneration study. *Chemosphere*, 75: 398–404, 2009.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FANTA, E.; TURCARATTI, N. M.; CARDOSO, R. J.; CARVALHO, C. S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces, Siluroidei). **Biocell**, 20: 171-178, 1996.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P. H.; RANDI, M. A. F.; RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M. , PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, 101: 74-80, 2006.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. **Journal of Biological Chemistry**, 239: 2370-2378, 1964.

OROPESA, A. L.; GARCÍA-CAMBERO, J. P.; SOLER, F. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 27: 30-38, 2009.

ORZALESI, N.; MIGLIAVACCA, L. MIGLIOR, S. Subretinal neovascularization after naphthalene damage to the rabbit retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 35: 696-705, 1994.

OSMAN, A. G. M.; MEKKAWY, I. A.; VERRETH, J.; WUERTZ, S.; KLOAS, W.; KIRSCHBAUM, F. Monitoring of DNA breakage in embryonic stages of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) after exposure to lead nitrate using alkaline comet assay. **Environmental Toxicology**, 23: 679-687, 2008.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 38: 252-259, 1997.

PACHECO, M., SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmental contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49 (1): 64-75, 2001.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene and β -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. **Environment International**, 28: 285-293, 2002.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 26: 345-356, 1995.

PAIN, D. J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J. (Eds.), **Handbook of Ecotoxicology** (p. 356-391). Boca Raton: Lewis, 1995.

PAMPLONA, J. H.; OBA, E. T.; SILVA, T. A.; RAMOS, L. P.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, *in press*, D.O.I: 10.1016/j.ecoenv.2010.09.010, 2010.

PANDEY, S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; SHARMA, S.; SRIVASTAVA, S. K.; VERMA, M.S. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 65: 56-61, 2006

PANTALEÃO, S. M.; ALCÂNTARA, A. V.; ALVES, J. P.; SPANO, M. A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 47: 219-224, 2006.

PAN-UK. Disponível em: <http://www.pan-uk.org/pestnews/actives/fipronil.htm>. Acesso em 10 ago 2007.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S. Hepatocyte nuclear structure and subcellular distribution of copper in zebrafish *Brachydanio rerio* and roach *Rutilus rutilus* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to copper sulphate. **Aquatic Toxicology**, 77: 306-313, 2006.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, 50: 109-124, 2000.

PARK, S.; NAM, H.; CHUNG, N.; PARK, J. D.; LIM, Y. The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles. **Toxicology In Vitro**, 20: 851-857, 2006.

PATRICK, L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. **Alternative Medicine Reviews**, 11: 114-127, 2006.

PATTEE, O. H.; PAIN, D. J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. JR.; CAIRNS, J. JR. **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton, FL, 2 ed., p. 373-408, 2002.

PAYNE, J. F. Field evaluation of benzo[a] pyrene hydroxylase induction as monitor for marine petroleum pollution. **Science**, 191: 945-946, 1976.

PAYNE, J. F.; FRANCEY, L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 86: 233-245, 1987.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, and old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, 32: 225-231, 1996.

PEAKALL, D. 1992. **Animal biomarkers as pollution indicators**, 1 ed. Chapman & Hall, London.

PEAKALL, D. B. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News Journal**, 1: 55-60, 1994.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, Série cadernos de Referência, p.12, 2002.

PETERS, L. D.; MORSE, H. R.; WATERS, R.; LIVINGSTONE, D. R. Responses of hepatic cytochrome P4501A and formation of DNA - adducts in juveniles of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to water-borne benzo[a]pyrene. **Aquatic Toxicology**, 38: 67-82, 1997.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture International**, 7: 201-205, 1999.

PIMPÃO, C. T.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 88 (2): 122-127, 2007.

PLUTA, H. J. Investigation on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in fish liver. In: BRUNBECK, T., HANKE, W., SEGNER, H. (Eds.), **Fish: Toxicology and Ecophysiology**. Weinheim Publishers, Germany: 170-190, 1993.

POLLINO, C. A.; HOLDWAY, D. A. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 52: 180-189, 2002.

POMA, A.; PITTALUGA, E.; TUCCI, A. Lead acetate genotoxicity on human melanoma cells in vitro. **Melanoma Research**, 13: 563-566, 2003.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, 30: 277-90, 1995.

POTTS, W. T. W.; PARRY, G. **Osmotic and Ionic Regulation in Animals**, Pergamon, Oxford, 1964.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; HOEHNE, L.; DRESSLER, V. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 58: 1008-1014, 2010.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E. AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60: 147-156, 2005.

RAMSDORF, W. A. **Utilização de duas species de Astyanax (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Canguiri – UFPR)**. Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2007.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M.; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental and Monitoring Assessment**, 158: 77-85, 2009a.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. S. F.; FERRARO, M. V. M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, 673: 78-81, 2009b.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington: 665p, 1985.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTHY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. (Ed.), **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. 2 ed. Taylor & Francis, Washington, DC, 1995.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; GORBI, S. Antioxidant efficiency in early life stages of the antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. **Aquatic Toxicology**, 75: 43-52, 2005.

RTI (Research Triangle Institute), 1999. **Toxicological Profile for Lead**. US Department of Health and Human Services. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

RODRIGUEZ-CEA, A. AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56: 442-448, 2003.

ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R. van GESTEL, C. A. M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, 64: 451-460, 2003.

ROMANELLI, M. F. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes DSS e LAS submetidos à irradiação com feixes de elétrons**. Dissertação de Mestrado, São Paulo, 2004.

ROMANI, R.; ANTOGNETTI, C.; BALDRACCHINI, F.; DE SANTIS, A.; ISANI, G.; GIOVANNINI, E.; ROSI, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, 145: 321-329, 2003.

ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei)**. Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2008.

SAEED, M.; HIGGINBOTHAM, S.; GAIKWAD, N.; CHAKRAVARTI, D.; ROGAN, E.; CAVALIERI, E. Depurinating naphthalene –DNA adducts in mouse skin related to cancer initiation. **Free Radical Biology & Medicine**, 47: 1075–1081, 2009.

SÁNCHEZ, P.; LLORENTE, M. T.; CASTAÑO, A. Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, vincristine sulfate and benzo(a)pyrene. **Mutation Research**, 465: 113-122, 2000.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, 13: 53-58, 2003. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/pesticidas/article/view/3165/2538>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2009.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R.; AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49: 139-143, 2001.

SANCHEZ-GALAN, S.; LINDE, A. R.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 43: 301-304, 1999.

SANCHO, E.; FERNANDEZ-VEGA, C.; SANCHEZ, M.; FERRANDO, M. D.; ANDREU-MOLINER, E. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 46: 57-63, 2000.

SANTOS, L. M. F. **Atividade de etoxiresorufina-o-desetilase, frequência de micronúcleos, níveis de metais, índice hepático e fator de condição em peixes provenientes da bacia do rio Paraíba do Sul.** Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro, 2004.

SANTOS, E. **Peixes de água doce.** Ed. Itatiaia. Belo Horizonte, 1981.

SANTOS, T. C. A.; NGAN, P. V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; GOMES, V. Effects of naphthalene on metabolic rate and ammonia excretion of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 335: 82-90, 2006.

SAWYER, C. H. Cholinesterase and the behavior problem in *Amblystoma*. III. The distribution of cholinesterase in nerve and muscle throughout development. **Journal of Experimental Zoology**, 94: 1-31, 1943.

SAWYER, C. H. Nature of the early somatic movements in *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Cellular Comparative Physiology**, 24: 71- 84, 1944.

SAYED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56 (2): 295-301, 2003.

SCHEWE, T.; RAPOPORT, S. M.; KÜHN, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxxygenase: comparison with other lipoxxygenases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, 58: 191-272, 1986.

SCHIRMER, K.; DIXON, D. G.; GREENBERG, B. M.; BOLS, N. C. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to acelline from the rainbow trout gill. **Toxicology**, 127: 129-141, 1998.

SCHIRMER, K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. **Toxicology**, 224: 163-183, 2006.

SCHLENK, D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. **Marine Pollution Bulletin**, 39: 48-53, 1999.

SCHLENK, D.; HUGGETT, D. B.; ALLGOOD, J.; BENNETT, E.; RIMOLDI, J.; BEELER, A. B.; BLOCK, D.; HOLDER, A. W. HOVINGA, R.; BEDIANT, P. Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambarus sp.*: Field and Laboratory Studies. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 4: 325-332, 2001.

SCHLENK, D. Biotransformation in Fishes. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes**. USA: CRC press, p.153-234, 2008.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, 31: 9-15, 1975.

SCOTT, K. L.; LECAK, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**, 19 (2): 127-142, 2005.

SENGER, M. R.; ROSEMBERG, D. B.; RICO, E. P.; ARIZI, M. B.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. *In vitro* effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Toxicology In Vitro**, 20: 954-958, 2006.

SETTI, A. A. **Diagnóstico sobre a situação dos mananciais dos 20 municípios selecionados dos Estados do Acre, Pará, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás e Proposta de Estruturação do Programa de Preservação e Conservação de Mananciais**. Relatório Técnico: PNMA, Contrato nº96/9596, 1998. 383p.

SEVANIAN, A.; MCLEOD, L. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: WALLACE, K. B. **Free Radical Toxicology**. Washington: Taylor & Francis, 47-70, 1997.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid peroxidation in membranes and low density lipoproteins: similarities and differences. **Free Radical Biology & Medicine**, 29: 306-311, 2000.

SEVGILER, Y.; ELIF, E. O.; OZCAN, O.; NEVIN, E. U. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 78: 1-8, 2004.

SHAHUNTHALA, D.; HODSON, P.V.; KHAN, C.W.; LEEB, K. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 59: 300-308, 2004.

SHAILAJA, M. S.; D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus*. **Chemosphere**, 53: 835-841, 2003.

SHUGART, L. R. DNA damage as a biomarker of exposure. **Ecotoxicology**, 9: 329-340, 2000.

SILBERGELD, E. K. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. **Mutation Research**, 533: 121-133, 2003.

SILBERGELD, E. K.; WAALKES, M.; RICE, J. M. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. **American Journal of Industrial Medicine**, 38: 316-323, 2000.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SILVA, H. C.; MEDINA, H. S. G.; FANTA, E.; BACILA, M. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (Methyl Parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces, Teleostei). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 105: 197-201, 1993.

SILVA DE ASSIS, H. C. **O uso de biomarcadores para avaliação de poluição aquática**. Tese de doutorado, Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 1998.

SILVA DE ASSIS, H. C.; NICARETA, L.; SALVO, L. M.; KLEMZ, C.; TRUPPEL, J. H.; CALEGARI, R. Biochemical Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Fish, *Ancistrus multispinis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52 (6): 1401-1407, 2009.

SILVA, C. A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; KATSUMITI, A.; ARAÚJO, M. L. P.; ZANDONÁ, E. M. COSTA SILVA, G. P.; MASCHIO, J.; ROCHE, H.; SILVA DE ASSIS, H. C. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72: 400- 409, 2009.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p 424, 2003.

SIMONATO, J. D.; ALBINATI, A. C. L.; MARTINEZ, C. B. R Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* Valenciennes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 76: 505-511, 2006.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quatification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175: 184-191, 1988.

SINGH, V. K.; JYOTI; KRISHNA REDDY, M. M.; KESAVACHANDRAN, C.; RASTOGI, S. K.; SIDDIQUI, M. K. J. Biomonitoring of organochlorines, glutathione, lipid peroxidation and cholinesterase activity among pesticide sprayers in mango orchards. **Clinica Chimica Acta** 377: 268-272, 2007.

SMITH, J. D., BAGG, J., WRIGLEY, I. Extractable polycyclic hydrocarbons in water from rivers in southeastern Australia. **Water Research**, 25: 1145-1150, 1991.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (Single-cell gel test), A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D. S. (Ed.), **Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols - Eukaryotic Systems**, 113: 203-211, 1999.

SRIVASTAVA, A.; HARISH, S. R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity of the roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight & Arn.). **Food Science and Technology**, 39: 1059-1065, 2006.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R. T.; FORLIN, L.; FOWLER, B. M.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, In HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. (Eds.), **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 235, 1992.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species, In OSTRANDER, G. K.; MALINS, D. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**, Lewis Publishers, Boca Raton, FL., 1994.

STEHR, C. M.; LIMBO, T.; INCARDONA, J. P.; SCHOLZ, N. L. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. **Toxicological Sciences**, 92 (1): 270-278, 2006.

STENESH, J. **Biochemistry**, Plenum Press, New York, 1998.

STEPHENSEN, E.; ADOLFSSON-ERICI, M.; CELANDER, M.; HULANDER, M.; PARKKONEN, J.; HEGELUND, T.; STURVE, J.; HASSELBERG, L.; BENGTSSON, M.; FÖRLIN, L. Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22: 2926-2931, 2003.

STEPHENSEN, E.; ADOLFSSON-ERICI-M.; HULANDER, M.; PARKKONEN, J.; FÖRLIN, L. Rubber additives induce oxidative stress in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, 75: 136-143, 2005.

STEVENS, M. M.; HELLIWELL S. S.; WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, 57: 195-207, 1998.

STIEN, X.; PERCIC, P.; GNASSIA-BARELLI, M.; ROMÉO, M.; LAFAURIE, M. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. **Environmental Pollution**, 99: 339-345, 1998.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 29 (12): 1715-1733, 1996.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, 47: 1-10, 1999.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19: 1607-1615, 2000.

STURVE, J.; HASSELBERG, L.; FALTH, H.; CELANDER, M.; FÖRLIN, L. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquatic Toxicology**, 78: 73-78, 2006.

SUMANAS, S.; LIN, S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. **Drug Discovery Today: TARGETS**, 3 (3): 89-96, 2004.

TAO, S.; LIU, C.; DAWSON, R.; CAO, J.; LI, B. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 37: 352-357, 1999.

TELES M.; PACHECO, M.; SANTOS M. A. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin *O*-deethylation, glutathione *S*-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 55: 98-107, 2003.

TERRA, B. F.; ARAÚJO, F. G.; CALZA, C. F.; LOPES, R. T.; TEIXEIRA, T. P. Heavy metal in tissues of three fish species from different trophic levels in a tropical Brazilian river. **Water, Air, and Soil Pollution**, 187: 275-284, 2008.

TEW, K. D.; RONAI, Z.E. GST function in drug and stress response. **Drug Resistance Updates**, 2: 143-147, 1999.

THOMAS, P., BUDIANTARA, L. Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in Atlantic croaker. **Marine Environmental Research**, 39: 147-150, 1995.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAURER, S.; KING, W. J. **Health and environmental effects of fipronil**, PAN-UK, 2000. Disponível em <http://www.pan-uk.org/Publications/Briefing/fipronil.pdf>. Acesso em 30 jan 2009.

TINTOS, A.; GESTO, M.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 66: 139-147, 2007.

TRUSCOTT, B., IDLER, D., FLETCHER, G. Alteration of reproductive steroids of male winter flounder (*Pleuronectes americanus*) chronically exposed to low levels of crude oil in sediments. **Canadian Journal of Aquatic Science**, 49: 2190-2195, 1992.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, 79: 201-204, 2006.

ÜNER, N.; ORUÇ, E. O.; SEVGILER, Y.; SAHIN, N.; DURMAZ, H.; USTA, D. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21: 241-245, 2005.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64: 178-189, 2006.

VALBONESI, P.; SARTOR, G.; FABBRI, E. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. **The Science of the Total Environment**, 312: 79-88, 2003.

VALENTIM, L. A. **Boas práticas de laboratório: aplicação para avaliar o impacto ambiental causado pelo derrame de derivados do petróleo**. Dissertação de Mestrado, São Carlos, 2006.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13: 57-149, 2003.

VAN DER OOST, R.; HEIDA, H.; OPPERHUIZEN, A.; VERMEULEN, N. P. E. Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutions (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs) and MFO-induction in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 100: 43-54, 1991.

VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, 28: 711-717, 2003.

VENKATESWARA RAO, J. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 86: 78-84, 2006.

VIEIRA, L. R.; SOUSA, A.; FRASCO, M. F.; LIMA, I.; MORGADO, F.; GUILHERMINO, L. Acute effects of Benzo (a) pyrene, anthracene and fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Science of the Total Environment**, 395: 87-100, 2008.

VIGANO, L.; ARILLO, A.; MELODIA, F.; ARLATI, P.; MONTI, C. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the river Po, Italy. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17: 404-411, 1998.

VIJAYAVEL, K.; GOMATHI, R. D.; DURGABHAVANI, K.; BALASUBRAMANIAN, M. P. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. **Marine Pollution Bulletin**, 48: 429-433, 2004.

VISVARDIS, E. E.; TASSIOU, A. M.; PIPERAKIS, S. M. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and λ -irradiation with the alkaline comet assay. **Mutation Research**, 383: 71-80, 1997.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996.

WALSE, S. S.; PENNINGTON, P. L.; SCOTT, G. I.; FERRY, J. L. The fate of fipronil in a modular estuarine mesocosm. **Journal of Environmental Monitoring**, 6: 58-64, 2004.

WEISS, C. M. Stream Pollution – Response of fish to sub-lethal exposures of organic phosphorus insecticides. **31st Annual Meeting Federation of Sewage and Industrial Wastes**, Detroit, 31 (5), 1958.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book: Guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**, University of Oregon, 4 ed, Eugene, 2000. Disponível em http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html. Acesso em 11 nov 2010.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. 2 ed, Vol 1: Recommendations. Geneva, World Health Organization, p 188, 1993.

WILHELM- FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T. B.; PEDROSA, R. C.; SOARES, C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 719-726, 2001.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs? **Ecological Economics**, 39: 449-462, 2001.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeires de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, 23 (2): 507-514, 2001.

WRIGHT, D.A.; WELBOURN, P. **Environmental Toxicology**. New York, N.Y.: Cambridge University Press, 2002.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princpios e Aplicaes**. 1a edição, 2006.

ZHANG, J. F.; WANG, X. R.; GUO, H. Y.; WU, J.C.; XUE, Y. Q. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 58: 110-116, 2004.

ZHAO, J. Z.; WU S. C.; ZHU, G. R. Bioassays with recommended field concentrations of several insecticides for resistance monitoring in *Plutella xylostella*. **Resistance Pesticide Management**, 7 (1): 13-14, 1995.

ZINKL, J. G.; LOCKHARD, W. L.; KENNY, S. A.; WARD, F. J. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: MINNEAU (Ed), **Cholinesterase inhibiting insecticides**. Elsevier: Amsterdam, 233-254, 1991.

Anexos

Metodologia detalhada para Biomarcadores Genéticos

Teste do Micronúcleo Písceo

A fim de se verificar a frequência de micronúcleos em hemácias periféricas, foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975), com algumas modificações.

A técnica aplicada consistiu das etapas:

- a) As lâminas foram bem limpas e identificadas.
- b) Ao se coletar o sangue do peixe, colocou-se uma gota na superfície da lâmina.
- c) Com o auxílio de uma lamínula, foi feito um esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina (técnica de extensões sanguíneas).
- c) Foi confeccionada uma lâmina por peixe.
- e) As lâminas, após a secagem ao ar, foram fixadas em etanol 96% por 30 minutos em cubetas.
- f) As lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos e lavadas em água corrente.
- g) Foram analisadas 2000 células de cada peixe em teste cego, sendo que somente foram consideradas na análise hemácias nucleadas com membrana nuclear e citoplasmática intactas. Foram consideradas como micronúcleos partículas que, em relação ao núcleo principal, não excederam $\frac{1}{3}$ do seu tamanho, apresentavam-se nitidamente separadas, com bordas distinguíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, também foram analisadas, sendo descritas como alterações morfológicas nucleares (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

Ensaio Cometa

A técnica utilizada foi a descrita por SPEIT e HARTMANN (1999), sendo feitas algumas alterações, conforme FERRARO, 2003. Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose e a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) segundo as etapas descritas a seguir.

Preparação das lâminas com cobertura de agarose

- a) Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi então levada ao forno de microondas até sua fervura e completa dissolução.
- b) Após fervura, a agarose foi deixada em temperatura ambiente. Após a solidificação da agarose, esta foi picada e levada novamente ao forno de microondas. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Ao final desse processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70°C.
- c) As lâminas, previamente limpas, foram então mergulhadas na agarose aquecida, sendo o lado da lâmina contendo a porção não esmerilhada limpo com um lenço de papel.
- d) As lâminas foram deixadas *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente para solidificar a cobertura de agarose.

Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- a) Foram dissolvidos 100 mg de agarose normal em 20 ml de PBS.
- b) Essa solução foi então levada para fervura em forno de microondas somente uma vez.
- c) A agarose foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando foi então aquecida em banho-maria e mantida em 37°C.

Os animais sacrificados foram previamente anestesiados e o material coletado (sangue e tecido hepático) foi armazenado em tubo de microcentrífuga do tipo ependorf e mantido sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem das lâminas.

Ensaio Cometa com Sangue

Para o ensaio cometa com sangue, o procedimento para montagem das lâminas consistiu das seguintes etapas:

- a) Foram coletados 10 µl de sangue de cada animal e misturados com 1 ml de soro bovino fetal. Desta solução, foram coletados 10 µl e misturados com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).
- b) Esta suspensão celular foi então depositada sobre uma lâmina que já estava com a cobertura de agarose.

- c) Após a deposição da mistura agarose LMP e suspensão celular sobre a lâmina, esta foi então coberta com lamínula e levada a geladeira por 15 minutos.
- d) Depois de decorrido o tempo de refrigeração, as lamínulas foram gentilmente retiradas.
- e) As lâminas foram acondicionadas em cubetas contendo a solução de lise por 24 horas.
- f) Após o tempo na solução de lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese. As lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal e, quando necessário, os espaços existentes foram preenchidos com lâminas limpas.
- g) A cuba foi mantida sob refrigeração e no escuro.
- h) Na cuba de eletroforese, foi suavemente adicionada a solução de eletroforese com pH >13, de maneira a cobrir as lâminas.
- i) Antes do início da corrida eletroforética, as lâminas ficaram na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA.
- j) Em seguida, iniciou-se a corrida de eletroforese a 25V e 300 mA por 25 minutos.
- l) Após o tempo de corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com um tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos. Esse processo foi realizado em três seções, com 5 minutos para cada seção. A neutralização foi realizada aplicando diretamente o tampão sobre as lâminas com o auxílio de uma pipeta sobre uma superfície plana.
- m) Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos.
- n) As lâminas foram então guardadas para posterior coloração e visualização.
- o) Para a coloração, foram adicionados 25 µl de brometo de etídeo (0,02 g/ml) em cada lâmina, coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência com aumento de 400x.
- p) Foram analisados, em teste cego, 100 nucleóides em cada lâmina.
- q) Os núcleos foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. Os núcleos foram classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo destruído ou em apoptose).
- r) Foi realizada a quantificação dos tipos de danos e a atribuição de escores em cada classe. Os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

Metodologia detalhada para Biomarcadores Bioquímicos

Atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro

Foram retirados os cérebros dos animais e acondicionados em frasco de microcentrífuga do tipo eppendorf e mantidos em gelo e posteriormente transferidos para freezer -70°C .

Para análise da acetilcolinesterase, após descongelados, os cérebros foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 (proporção 1:1) utilizando homogeneizador de pequenas amostras. Os homogeneizados foram mantidos em gelo e ao término, foram centrifugados por 20 min a 4°C e 10.000 g. O homogeneizado armazenado foi diluído em tampão fosfato 7.5 na proporção 1:5. Também foi separada uma alíquota (50 μl) de cada amostra para dosagem de proteínas pelo método de Bradford. Após, os eppendorfs foram agitados em vórtex e mantidos refrigerados em gelo. Foram preparadas a solução de DTNB (ácido 2 nitrobenzóico) 0,75mM e de ACT (acetilcolina iodeto) 9mM.

Na microplaca, foi adicionado 50 μl da amostra diluída, 200 μl de DTNB 0,75 mM e 50 μl de ATC 9 mM. Foram realizadas leituras de absorbâncias em leitor de placas em 405nm. A dosagem das proteínas foi feita através do método de Bradford (1976) com curva de BSA (soro de albumina bovina) como padrão.

Atividade de Acetilcolinesterase em Músculo

a) Foram retirados fragmentos de músculos sem peles e sem escamas dos animais e acondicionados em frasco de microcentrífuga do tipo eppendorf e mantidos em gelo e posteriormente transferidos para freezer -70°C .

b) Para análise da acetilcolinesterase, após serem descongelados, estes fragmentos foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 na proporção 2 partes de tampão: 1 parte de tecido muscular utilizando homogeneizador de pequenas amostras. Os homogeneizados foram mantidos em gelo e ao término, foram centrifugados por 20 minutos, a 4°C e 10.000 x g. O sobrenadante foi retirado e aliquotado para leitura da atividade da acetilcolinesterase muscular e também dosagem de proteínas (pelo método de Bradford).

Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) em fígado

Os fígados dos animais foram retirados e mantidos em tubos do tipo ependorfe em gelo. Posteriormente foram mantidos em freezer -70°C. Para análise das enzimas GST, EROD e LPO, alíquotas de fígado após serem descongelados, foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1M pH 6,5 utilizando homogeneizador de pequenas amostras. Os homogeneizados foram mantidos em gelo centrifugados por 20 min, a 4°C e 10.000g. O sobrenadante foi retirado, aliquotado em ependorfes e mantido em freezer -70°C.

Para atividade da EROD, foram preparadas soluções de 7-etoxiresorufina 260 µM em metanol (solução estoque) e 20 mM de NADPH (solução estoque). Para uso, foram preparadas as soluções 2,6µM de 7-ER em tampão TRIS-NaCl pH 7,5 e 2,6 mM de NADPH.

Para análise da atividade, foram pipetados em microplaca escura 50 µl da amostra pura (homogeneizado aliquotado em freezer -70°C ; 4 réplicas) e 200 µl da solução de 7 ER 2,6µM e após incubação por 5 minutos, foram adicionados 10 µl da solução de NADPH 2,6 mM. Foi realizada a leitura, em fluorímetro de microplaca, da atividade da enzima utilizando os filtros 530 nm e 590nm (excitação e emissão, respectivamente) por 10 minutos, a 27°C. Os dados foram analisados utilizando uma curva padrão da resorufina.

Glutathione S-transferase (GST) em fígado

Os fígados dos animais foram retirados e mantidos em tubos do tipo ependorfe em gelo. Posteriormente foram mantidos em freezer -70°C. Para análise das enzimas GST, EROD e LPO, alíquotas de fígado após serem descongelados, foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1M pH 6,5 utilizando homogeneizador de pequenas amostras. Os homogeneizados foram mantidos em gelo centrifugados por 20 min, a 4°C e 10.000xg. O sobrenadante foi retirado, aliquotado em ependorfes e mantido em freezer -70°C.

Para GST, o homogeneizado foi diluído em tampão fosfato 6.5 na proporção 1:4. Também foi separada uma alíquota (10 µl) de cada amostra para dosagem de proteínas pelo método de Bradford. Após, os ependorfes foram agitados em vórtex e mantidos refrigerados em gelo.

Foram preparadas a solução mãe GSH + CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno)
GSH: 3 mM + CDNB: 3 mM para jundiás e
GSH 2mM + CDNB 2,5 mM para lambaris e paulistinhas.

Na microplaca, adicionamos 50 µl da amostra diluída + 150 µl da solução reação. A leitura foi feita em espectrofotômetro de microplaca 340 nm, 2 minutos, em intervalos de 12 segundos.

Lipoperoxidação (LPO) em fígado

Os fígados dos animais foram retirados e mantidos em tubos do tipo ependorfe em gelo. Posteriormente foram mantidos em freezer -70°C . Para análise dos níveis de LPO alíquotas de fígado após serem descongelados, foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M pH 6,5 utilizando homogeneizador de pequenas amostras. Os homogeneizados foram mantidos em gelo e ao término, foram centrifugados por 20 min, a 4°C e $10.000 \times g$. O sobrenadante foi retirado e aliquotado em ependorfes e mantidos em freezer -70°C .

Para LPO, o homogeneizado armazenado em freezer foi diluído em metanol 90% na proporção 1:2 - 1 parte de amostra e 1 parte de metanol 90%. Após, os ependorfes foram agitados em vórtex e mantidos refrigerados em gelo. O material foi centrifugado por 20 min a 4°C e $10.000 \times g$.

Foi preparada a solução de reação:

89 ml de metanol absoluto

8 ml de água destilada

0,0076g de xilenol orange em 1 ml de água destilada

0,25 ml de ácido sulfúrico concentrado

0,0882g de BHT em 1 ml de etanol absoluto

0,0098g de sulfato ferroso amoniacal em 1 ml de água destilada

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 30 μl em cada poço da microplaca (4 réplicas) e 270 μl da solução reação. Após incubação por 30 minutos em microplaca envolta papel alumínio e em temperatura ambiente, as amostras foram lidas em 570 nm em espectrofotômetro de microplaca.